Aus den Forschungslaboratorien
der Schering AG, Berlin/Bergkamen

Experimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der durch Sulfonylharnstoffe verursachten Hemmung der Thrombocytenaggregation

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christa Scholz

aus Berlin

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0049

Aus den Forschungslaboratorien
der Schering AG, Berlin/Bergkamen

Experimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der durch Sulfonylharnstoffe verursachten Hemmung der Thrombocytenaggregation

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christa Scholz

aus Berlin

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Wolfgang Losert

Korreferent: Prof. Dr. med. F. von Bruchhausen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7. Juni 1974

Gliederung

1. Einleitung

2. Methoden

2.1. Tiermaterial

2.2. Verwendete Substanzen

2.3. Beeinflussung der Blutglucose (in vivo-Versuche)

2.3.1. Versuchsanordnung

2.3.2. Glucosebestimmung

2.4. Beeinflussung der Insulinsekretion (in vivo)

2.4.1. Versuchsanordnung

2.4.2. Insulinbestimmung

2.5. Beeinflussung der ADP-induzierten Thrombocytenaggregation (in vitro)

2.5.1. Gewinnung von TRP

2.5.2. Bestimmung der Thrombocytenkonzentration im TRP mit dem Coulter-Counter

2.5.3. Messung der Thrombocytenaggregation

2.6. Beeinflussung der cAMP-Konzentration

2.6.1. Bestimmung in der Leber (in vivo)

2.6.2. Bestimmung im Serum (in vivo)

2.6.3. Bestimmung in Thrombocyten (in vitro-Versuche mit TRP)

2.6.4. cAMP-Messung

2.6.4.1. Herstellung von cAMP-Bindungsprotein

2.6.4.2. Durchführung der Messung

2.6.4.3. Spezifität der Methode

2.6.4.4. Zuverlässigkeit der Methode

2.7. Beeinflussung der PGE_2-Konzentration in Thrombocyten (in vitro-Versuche mit TRP)

2.7.1. Versuchsanordnung

2.7.2. PGE_2-Bestimmung

2.8. Statistik

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der blutglucosesenkenden Wirkung verschiedener oraler Antidiabetica mit ihrem Einfluß auf die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation

3.1.1. Blutglucosesenkende Wirkung

3.1.2. Hemmung der Thrombocytenaggregation

3.2. Beziehungen zwischen Prostaglandinsynthese und Hemmung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation durch Sulfonylharnstoffe

3.2.1. Einfluß von PGE_1, PGE_2 und $PGE_{2\alpha}$ auf die Thrombocytenaggregation

3.2.2. Einfluß von Hemmstoffen der Prostaglandinsynthese (nichtsteroidale Entzündungshemmstoffe) auf die Thrombocytenaggregation

3.2.3. Einfluß von Sulfonylharnstoffen und nichtsteroidalen Entzündungshemmstoffen auf die PGE_2-Konzentration in thrombocytenreichem Plasma

3.2.4. Einfluß einer Kombination von Sulfonylharnstoffen und Hemmstoffen der Prostaglandinsynthese auf die Thrombocytenaggregation

3.3. Beziehungen zwischen dem cAMP-System und der durch Sulfonylharnstoffe verursachten Hemmung der Thrombocytenaggregation

3.3.1. Beeinflussung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation durch cAMP und Substanzen mit nachgewiesener Wirkung auf das cAMP-System

3.3.1.1. Dibutyryl-adenosin-3', 5'-monophosphat (DBcAMP)

3.3.1.2. Substanzen mit steigernder Wirkung auf die cAMP-Konzentration (durch Stimulation der Adenylatcyclase oder Hemmung der Phosphodiesterase)

3.3.1.3. Substanzen mit senkender Wirkung auf die cAMP-Konzentration (durch Aktivitätsabnahme der Adenylatcyclase oder Stimulation der Phosphodiesterase)

3.3.2. Beeinflussung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation durch Acetylcholin, cGMP und andere cAMP-Analoga

3.3.3. Beeinflussung des aggregationshemmenden Effekts von Sulfonylharnstoffen durch Substanzen mit nachgewiesener Wirkung auf das cAMP-System

3.3.3.1. Sulfonylharnstoffe und Imidazol

3.3.3.2. Sulfonylharnstoffe und Theophyllin

3.3.3.3. Sulfonylharnstoffe und α- oder ß-Rezeptorenblocker

3.3.3.4. Sulfonylharnstoffe und PGE_1

3.3.4. Einfluß von Sulfonylharnstoffen auf die cAMP-Konzentration in Thrombocyten (TRP)

3.3.4.1. Beeinflussung der cAMP-Konzentration durch PGE_1, Isoproterenol, Theophyllin und Imidazol

3.3.4.2. Beeinflussung der cAMP-Konzentration durch PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, ADP und Acetylsalicylsäure

3.3.4.3. Beeinflussung der cAMP-Konzentration durch Tolbutamid, Glisoxepid, Glibenclamid und ZK 28 2oo

3.4. Beziehungen zwischen dem cAMP-System und dem ß-cytotropen Effekt verschiedener Sulfonylharnstoffe

3.5. Beeinflussung der cAMP-Konzentration in der Leber und im Serum durch Sulfonylharnstoffe

4. Diskussion

4.1. Beeinflussung der Thrombocytenaggregation durch Sulfonylharnstoffe

4.1.1. Beziehungen zwischen Sulfonylharnstoffen und Prostaglandinen

4.1.2. Sulfonylharnstoffe und cAMP-Stoffwechsel in Thrombocyten und anderen Zellarten

4.2. Steuerung der Thrombocytenaggregation durch cAMP und Prostaglandine

4.2.1. Spezifische hormonale und pharmakologische Beeinflussung des thrombocytären Cyclasesystems

4.2.2. Wirkungsweise von Theophyllin, Imidazol und Insulin

4.2.3. Stellung der Prostaglandine im Steuerungssystem der Thrombocyten

4.2.4. Wirkungsweise von aggregationsauslösenden Substanzen

4.3. Therapeutische Bedeutung des Sulfonylharnstoffeffekts

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Lebenslauf

1. Einleitung

Seit etwa 2o Jahren werden Sulfonylharnstoffe und Sulfonylaminopyrimidine zur Therapie des Erwachsenendiabetes verwendet. Bereits in seinen grundlegenden Experimenten konnte LOUBATIÈRES (1942, 1944) vor 3o Jahren zeigen, daß die blutglucosesenkende Wirkung dieser Substanzklasse an die Anwesenheit funktionstüchtiger Inseln in der Bauchspeicheldrüse gebunden ist. In der Folgezeit wurde durch eine große Anzahl von Untersuchern nachgewiesen, daß die Verbindungen die Insulinsekretion stimulieren (Übersichten bei PFEIFFER, SCHÖFFLING und DITSCHUNEIT, 1969; BÄNDER, 1971; MORCZINNECK, 1971; LOSERT, 1972, s. dort jeweils weit. Lit.). Dieser Effekt wird heute allgemein als die Ursache ihrer antidiabetischen Wirkung angesehen (PFEIFFER, SCHÖFFLING und DITSCHUNEIT, 1969).

Daß Sulfonylharnstoffe nicht nur die ß-Zellen beeinflussen, ist ebenfalls unumstritten. Da die meisten außerhalb dieser Zellen lokalisierten Effekte aber bisher nur in vitro unter verhältnismäßig hohen Wirkstoffkonzentrationen beobachtet wurden, ist nicht eindeutig geklärt, ob sie für die therapeutische Wirkung der Verbindungen von Bedeutung sind. Für einige dieser Effekte wäre dies grundsätzlich möglich, da sie den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel in der gleichen Richtung beeinflussen wie Insulin. So wurde gefunden, daß Sulfonylharnstoffe entweder selbst die Glucoseaufnahme in der Skelettmuskulatur steigern oder den gleichartigen Effekt von Insulin verstärken (MADSEN, 1967; FELDMANN und LEBOVITZ, 1969; LUNDBAEK, NIELSEN und RAFAELSEN, 1959; BÄNDER, 1971, s. dort weit. Lit.). In der Leber vermindern die Substanzen die Ketogenese (HASSELBLATT, 1967; RENOLD, ZAHND, JEANRENAUD und BOSHELL, 1959); dieser Effekt beruht auf einer Hemmung der Lipolyse (HASSELBLATT, 1969). Auch im Fettgewebe (bzw. weißen und braunen Fettzellen) wird die Triglyceridspaltung durch Sulfonylharnstoffe gehemmt (FAIN, ROSENTHAL und WARD, 1972; BROWN, STEELE, STONE und STEELE, 1972; ROSAK, BARTELT, HAUPT, BEYER und SCHÖFFLING, 1972; PULS, LOSERT, LOGE, SCHILLINGER, KEUP und KRONEBERG, 1973; FAULHABER, DITSCHUNEIT und DITSCHUNEIT, 1969). Möglicherweise reduzieren die Verbindungen die Glucagonsekretion aus den α-Zellen der Langerhansschen Inseln (SAMOLS, TYLER und MIALHE, 1969; LAUBE, FUSSGÄNGER, GOBERNA, SCHRÖDER, STRAUB, SUSSMANN und PFEIFFER, 1971). In der Leber wird außerdem die Gluconeogenese gehemmt (HASSELBLATT, PANTEN und POSER, 1969; MENAHAN und WIELAND, 1969; POSER, SCHÖNBORN, PANTEN, von KRIEGSTEIN und HASSELBLATT, 1971) und das Gleichgewicht zwischen Glycogensynthese und Glycogenolyse zugunsten des Glycogenaufbaus verschoben, wie bei einer Vielzahl von Untersuchungen festgestellt wurde (BÄNDER, 1971; PFEIFFER, SCHÖFFLING und DITSCHUNEIT, 1969; s. dort jeweils weitere Literatur). Diese Effekte könnten außer dem vermehrt freigesetzten Insulin für die Hemmung der hepatischen Glucoseabgabe verantwortlich sein, die in vivo durch Sulfonylharnstoffe verursacht wird (BÄNDER, 1971; s. dort weitere Literatur; GERHARDS, NIEUWEBOER und GUTSCHE, 1968).

Daneben besitzen Sulfonylharnstoffe auch extrapankreatische Wirkungen, die nicht den intermediären Stoffwechsel betreffen. Am Herzen wurde in vitro unter dem Einfluß von Tolbutamid eine geringe Zunahme der Kontraktilität beobachtet (ROTH, PROUT, GOLDFINE, WOLFE, MUENZER, GRAUER und MARCUS, 1971; LASSETER, LEVEY, PALMER und McCARTHY, 1972; CRASS, SPANHEIMER, STONE und BROWN, 1973). An der Niere zeigten einige

Verbindungen, besonders Chlorpropamid, eine antidiuretische Wirkung, die auch zur Therapie des Diabetes insipidus centralis ausgenutzt werden kann (ARDUINO, FERRAZ und RODRIGUES, 1966; MEINDERS, TOUBER und De VRIES, 1967; WIGGER, STEGEMANN, SCHELER und CREUTZFELDT, 1969).

Ein weiterer Angriffspunkt der Sulfonylharnstoffe wurde vor kurzem an Thrombocyten entdeckt. Hierbei handelt es sich um eine Hemmung der Thrombocytenaggregation, also des ersten Schrittes bei der Entstehung eines Thrombus. Auch dieser Effekt betrifft primär nicht den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel, beeinflußt aber einen Vorgang, der die wesentlichste Komplikation des Diabetes mellitus darstellt. Die erhöhte Thrombosegefahr bei Diabetikern resultiert nicht nur aus Gefäßwandläsionen als Folge der diabetischen Mikroangiopathie, sondern auch aus einer erhöhten Aggregationsbereitschaft der Thrombocyten (KWAAN, COLWELL, CRUZ, SUWANWELA und DOBBIE, 1972; KWAAN, COLWELL und SUWANWELA, 1972;). Eine Hemmung der Thrombocytenaggregation wurde in vitro bisher mit Tolbutamid (ROTH, PROUT, GOLDFINE, WOLFE, MÜENZER, GRAUER und MARCUS, 1971) und einer vor kurzem in die Therapie eingeführten neuen Substanz, Gliclazid, nachgewiesen (DESNOYERS, LABAUME, ANSTETT, HERRERA, PESQUETS und SEBASTIEN, 1972).

Da eine Hemmung der Thrombocytenaggregation von wesentlichem, therapeutischem Wert sein könnte oder zumindest das Fehlen einer entgegengesetzten Wirkung ein zusätzliches Risiko bei der Langzeitanwendung dieser Substanzen ausschließen würde, wurden mit verschiedenen antidiabetisch wirksamen Substanzen eingehende Untersuchungen zu diesem Problem durchgeführt. Hierbei interessierten folgende Fragen:

a. Wird eine Hemmung der Thrombocytenaggregation nur durch bestimmte Sulfonylderivate verursacht oder kann dieser Effekt als grundsätzliche Eigenschaft aller ß-cytotropen Sulfonylharnstoffe und ihnen gleichzusetzenden Sulfonylaminopyrimidine, sowie möglicherweise auch anderer Antidiabetica (Biguanide) angesehen werden?

b. Falls dies für Sulfonamidderivate zutrifft, bestehen zwischen verschiedenen Substanzen dieses Typs in Bezug auf die Hemmung der Thrombocytenaggregation die gleichen Unterschiede in der relativen Wirksamkeit wie in Bezug auf ihren ß-cytotropen, blutglucosesenkenden Effekt oder lassen sich Dissoziationen zwischen beiden Wirkungsqualitäten erkennen?

c. Bestehen Anhaltspunkte dafür, daß beide Wirkungen auf einem gleichen oder ähnlichen Angriffspunkt im Steuerungssystem der ß-Zellen bzw. Thrombocyten beruhen oder in dieser Hinsicht grundsätzliche Differenzen bestehen?

Trotz ihrer unterschiedlichen Aufgabe existieren in beiden Zellarten durchaus vergleichbare Funktionen und Steuerungssysteme. Aus den

ß-Zellen wird praeformiertes Insulin auf bestimmte physiologische Reize (Stoffwechselmetaboliten: Glucose, Aminosäuren, Hormone, Glucagon, ACTH, ß-adrenerge Catecholamine; Literatur siehe bei LOSERT, 1971) aus intracellulären Speicherorganellen, sogen. Granula, über einen als 'Emiocytose' bezeichneten Vorgang durch die Zellmembran geschleust und an den extracellulären Raum und damit das Blut abgegeben (LACY, 197o; MALAISSE, 1972; s. dort weitere Literatur). An diesem Prozeß ist ein mikrotubulär-mikrofilamentäres System beteiligt, das u.a. kontraktile Elemente enthält(ORCI, GABBAY und MALAISSE, 1972; LACY, WALKER und FINK, 1972; MALAISSE, LAGAE, GREIDER, MALAISSE und LACY, 1971; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE, WALKER und LACY, 1971; ADELSMAN, BORISY, SHELANSKI, WEISENBERG und TAYLOR, 1968). Man nimmt an, daß die Granula zunächst an die Zelloberfläche transportiert werden, anschließend ihre Hülle mit der Zellmembran verschmilzt und ihr Inhalt über eine Öffnung der gemeinsamen Membran nach außen abgegeben wird (LACY, 197o).

Der Sekretionsprozeß ist Ca^{++}-abhängig (GRODSKY und BENNETT, 1966; MILNER und HALES, 1967; MALAISSE, 197o). Er wird damit von der Permeabilität der Zellmembran für Ca^{++} und dem Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Calcium im Intracellulärraum gesteuert (MALAISSE, 1972; MALAISSE, 1973; BRISSON, CAMU, MALAISSE-LAGAE und MALAISSE, 1971; BRISSON, MALAISSE-LAGAE und MALAISSE, 1972). Weiterhin ist für die Insulinsekretion Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) von Bedeutung. cAMP vermittelt als intracelluläre Botensubstanz ('second messenger) die Wirkungen verschiedener nichtsteroidaler Hormone. Sie reagieren mit Rezeptoren an der Zelloberfläche und stimulieren dadurch über eine Adenylatcyclase die Bildung von cAMP aus ATP an der Innenseite der Membran. Durch eine cAMP-Phosphodiesterase wird das cyclische Nucleotid zu 5'-AMP abgebaut (Übersichten s. bei ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971; SCHULTZ, 1971, 1972; LOSERT, 1973). In den ß-Zellen führt eine Steigerung der cAMP-Synthese (z.B. durch Glucagon, ACTH oder Isoproterenol) zu einer Stimulation, eine Abnahme des cAMP-Gehaltes (z.B. durch die α-adrenerge Wirkkomponente der Catecholamine) zu einer Reduktion oder Hemmung der Insulinsekretion (MILLER, WRIGHT und ALLEN, 1972; TURTLE und KIPNIS, 1967; GENUTH und LEBOVITZ, 1965; LAMBERT, JEANRENAUD und RENOLD, 1967; LOSERT, LOGE und JAHN, 1973). Der insulinfreisetzende Effekt blutzuckersenkender Sulfonylharnstoffe wird wahrscheinlich nicht durch cAMP vermittelt (LOGE, LOSERT und JAHN, 1973; LOSERT, LOGE und JAHN, 1973; MALAISSE und MALAISSE-LAGAE, 197o; MALAISSE, MAHY und MALAISSE-LAGAE, 1971; BRISSON, MALAISSE-LAGAE und MALAISSE, 1972).

Auch aus den Thrombocyten werden über einen ähnlichen Sekretionsprozeß auf bestimmte Reize granulär gespeicherte Substanzen abgegeben. Außerdem sind diese Zellen in der Lage, ihre Membraneigenschaften so zu verändern, daß daraus eine erhöhte Aggregationsbereitschaft und Adhäsivität an Gefäßwänden resultiert (BORN, 1972; MUSTARD und PACKHAM, 197o). Hierbei sind ebenfalls kontraktile Proteine und ein mikrotubuläres System von Bedeutung (BORN, 1972; SHIO und RAMWELL, 1972; BETTEX-GALLAND und LÜSCHER, 1965; LÜSCHER und BETTEX-GALLAND, 1972).

Wie die Insulinsekretion ist die Thrombocytenaggregation Ca^{++}-abhängig und wird durch die intracelluläre cAMP-Konzentration beeinflußt (SHIO und RAMWELL, 1972; MUSTARD und PACKHAM, 197o). Dieser Vorgang wird jedoch im Gegensatz zur Inselfunktion durch cAMP nicht stimuliert, sondern in einer Steigerung der cAMP-Konzentration nimmt die Aggregationsfähigkeit der Zellen ab (SHIO und RAMWELL, 1972; HASLAM, 1973; MILLS und SMITH, 1971; SALZMAN, 1972).

Während über die Beeinflussung der Insulinsekretion durch Prostaglandine bisher nur wenige und nicht eindeutig interpretierbare Befunde vorliegen, scheinen diese Substanzen für die Thrombocytenfunktion von großer Bedeutung zu sein. Prostaglandine wurden bisher in vielen Zellarten nachgewiesen und haben mannigfaltige pharmakologische Wirkungen [HORTON, 1972, RAMWELL und PHARRISS (Herausgeber), 1972; BERGSTRÖM und BERNHARD (Herausgeber), 1973]. So wird die Thrombocytenaggregation durch Prostaglandin E_1 (PGE_1) gehemmt, während Prostaglandin E_2 (PGE_2) das Gegenteil bewirkt (SHIO, RAMWELL und JESSUP, 1972; SHIO und RAMWELL, 1972; SHIO, SHAW und RAMWELL, 1971). Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) scheint nach den bisherigen Ergebnissen keinen Einfluß auf die Thrombocytenaggregation auszuüben (RAMWELL, 1972). Nach einer Theorie von KUEHL (1972, 1973), die vornehmlich auf Befunden an isolierten Fettzellen der Ratte und dem Ovar der Maus, aber auch Untersuchungen an vielen anderen Geweben beruhen, sind E-Prostaglandine (PGE_1, PGE_2) eng mit dem cAMP-System verbunden und stellen im Rahmen eines 'feed-back'-Mechanismus lokale Modulatoren der cAMP-Synthese dar. F-Prostaglandine ($PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$) sollen dagegen in ein anderes celluläres Steuerungssystem eingeschaltet sein und möglicherweise in enger Beziehung zu Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) stehen.

Unter Berücksichtigung dieser Grundlagen sollten die Untersuchungen zum Mechanismus des Sulfonylharnstoffeffektes klären, ob

c.1. die Hemmung der Thrombocytenaggregation durch eine Beeinflussung der Synthese und Abgabe von Prostaglandinen erklärt werden kann und/oder über

c.2. eine davon abhängige/unabhängige Beeinflussung der Synthese oder des Abbaus von cAMP zustande kommt.

Sollten sich bei diesen Untersuchungen Differenzen im Angriffspunkt zwischen verschiedenen Sulfonylharnstoffderivaten ergeben, interessierte außerdem, ob

c.3. gleichartige Unterschiede auch für andere Zellen, insbesondere ß-Zellen, und damit für den insulinfreisetzenden Effekt dieser Substanzen gelten.

Die Versuche zur ß-cytotropen bzw. blutglucosesenkenden Wirkung wurden in vivo an Ratten durchgeführt. Da geeignete in vivo-Methoden zur quantitativen Beurteilung von Veränderungen der Thrombocytenaggregation und der ihnen zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht

existieren, wurden diese Experimente in vitro mit thrombocytenreichem Plasma (TRP) von Ratten vorgenommen.

2. Methoden

2.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten (Züchter: Dr. Hagemann, Bösingfeld/Lippe). Die Tierhaltung erfolgte unter konventionellen Bedingungen in Sammelkäfigen auf Holzspänen mit freiem Zugang zum Futter (Altromin R (R)-Trockenfutter, Firma Altrogge/Lage) und Trinkwasser. In vivo-Experimente wurden an 15o - 17o g schweren Tieren durchgeführt, denen entweder 18 Stunden oder unmittelbar vor Versuchsbeginn das Futter entzogen wurde. Zur Gewinnung von thrombocytenreichem Plasma für in vitro-Untersuchungen dienten gefütterte Ratten mit einem Gewicht zwischen 25o und 3oo g.

2.2. Verwendete Substanzen

Alle verwendeten Substanzen, ihre Herkunft, Lösung und Applikationsart sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Als Lösungsmittel diente in allen Fällen o,9%ige NaCl-Lösung. Sofern die Testverbindungen organische Säuren waren und nicht bereits als Natriumsalze vorlagen, erfolgte ihre Lösung unter Zusatz äquimolarer Mengen von NaOH. Prostaglandine (PGE_1, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$) wurden vor Zugabe der Kochsalzlösung in einem geringen Volumen absolutem Aethanol gelöst. Die Endkonzentration des Alkohols in den Meßproben betrug maximal o,32 %o.

2.3. Beeinflussung der Blutglucose (in vivo-Versuche)

2.3.1. Versuchsanordnung

Zur Prüfung ihrer blutglucosesenkenden Wirkung wurden die untersuchten Sulfonylharnstoff-Derivate in physiologischer NaCl-Lösung (5 ml/kg) den Versuchstieren in eine Schwanzvene injiziert. Kontrollen erhielten gleiche Volumina des Lösungsmittels. Vor und eine Stunde nach der Substanzapplikation erfolgte zur Glucosebestimmung je eine Blutentnahme durch Punktion des retrobulbären Venenplexus (HALPERN und PACAUD, 1951). Hierzu wurden spitz ausgezogene und schräg angeschliffene Glaspipetten verwendet. Das Futter wurde den Ratten erst zu Beginn des Versuches entzogen.

2.3.2. Glucosebestimmung

Prinzip: Glucose wird in Gegenwart von Luftsauerstoff durch das Enzym Glucose - Oxydase oxidiert. Hierbei entsteht

Tabelle 1

Substanzbezeichnung Generic name/ Code-Bezeichnung; Chemischer Name	Herkunft (Hersteller des Wirkstoffes)	Besonderheiten bei der Lösung NaOH = Zusatz einer äquimolaren NaOH-Menge Aethanol = Anlösen in Aethanol	Applikationsart in vitro	 in vivo: i.v.
Tolbutamid; N-(4-Methyl-benzol-sulfonyl)-N'-n-butyl-harnstoff	Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main	NaOH	+	+
Glymidin-Natrium (Glykodiazin); 2-Benzol-sulfonamido-5-methoxyäthoxy-pyrimidin, Natriumsalz	Dept. Arzneimittelchemie Schering AG Berlin/ Bergkamen		+	+
Glidanil-Natrium; 4-[N(5-Isobutyl-2-pyrimidinyl)-sulfamoyl]-phenylessigsäure-5-chlor-2-methoxy-anilid, Natriumsalz	Dept. Arzneimittelchemie Schering AG Berlin/ Bergkamen		+	+
Glisoxepid; 4-{4-[ß-(5-Methyl-isoxazol-3-carboxamido)-äthyl]-benzolsulfonyl}-1,1-hexamethylen-semicarbazid	Bayer AG Wuppertal-Elberfeld	NaOH	+	+
Glibenclamid; N-[4-(ß-⟨2-Methoxy-5-chlorbenzamido⟩-äthyl)-benzolsulfonyl]-N'-cyclohexyl-harnstoff	Farbwerke Hoechst AG Frankfurt/Main	NaOH	+	+

Fortsetzung Tabelle 1

Substanzbezeichnung Generic name/ Code-Bezeichnung; Chemischer Name	Herkunft (Hersteller des Wirkstoffes)	Besonderheiten bei der Lösung NaOH=Zusatz einer äquimolaren NaOH-Menge Aethanol=Anlösen in Aethanol	Applikationsart in vitro	 in vivo:i.v.
Gliclazid; N^1-p-Toluolsulfonyl-N^2-[3-(3-azabicyclo-o,3,3-oktyl)]-harnstoff	Laboratoires Servier, Orléans, Frankreich	NaOH	+	+
Tolazamid, N-p-tolylsulfonyl-N'-hexamethylen-iminoharnstoff	Upjohn Comp. Kalamazoo, Mich.,U.S.A.	NaOH	+	+
ZK 28 2oo, (-)-4-[N-(5-Isobutyl-2-pyrimidinyl)-sulfamoyl]-phenylessigsäure-1-(5-fluor-2-methoxyphenyl)-aethylamid	Dr. C. Rufer Dept. Arzneimittelchemie Schering AG, Berlin/ Bergkamen	NaOH	+	+
ZK 28 2o1, (+)-4-[N-(5-Isobutyl-2-pyrimidinyl)-sulfamoyl]-phenylessigsäure-1-(5-fluor-2-methoxyphenyl)-aethylamid	Dr. C. Rufer Dept. Arzneimittelchemie Schering AG, Berlin/ Bergkamen	NaOH	+	+
ZK 6o o49, 4-(1.1-Hexamethylen-4-semicarbazido-sulfonyl)-benzoesäure	Dr. C. Rufer Dept. Arzneimittelchemie Schering AG, Berlin/ Bergkamen	NaOH	+	+

Fortsetzung Tabelle 1

Substanzbezeichnung Generic name/ Code-Bezeichnung; Chemischer Name	Herkunft (Hersteller des Wirkstoffes)	Besonderheiten bei der Lösung NaOH=Zusatz einer äquimolaren NaOH-Menge Aethanol=Anlösen in Aethanol	Applikationsart in vitro	 in vivo:i.v.
Phenformin-Hydrochlorid; N^1-ß-Phenyläthyl-biguanid, Hydrochlorid	Dr. Christian Brunnengräber Chem. Fabrik und Co.mbH, Lübeck		+	
1-Butylbiguanid-Hydrochlorid; N^1-n-Butyl-biguanid, Hydrochlorid	Chemie Grünenthal GmbH Stolberg/Rhld.		+	
Indomethacin; 1-(p-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-essigsäure	Sharp + Dohme GmbH München	NaOH	+	
Acetylsalicylsäure	Bayer AG Wuppertal-Elberfeld	NaOH	+	
Imidazol	Fa. Schuchardt München		+	+

Fortsetzung Tabelle 1

Substanzbezeichnung Generic name/ Code-Bezeichnung; Chemischer Name	Herkunft (Hersteller des Wirkstoffes)	Besonderheiten bei der Lösung NaOH=Zusatz einer äquimolaren NaOH-Menge Aethanol=Anlösen in Aethanol	Applikationsart in vitro	 in vivo:i.v.
5-Methyl-isoxazol-3-carbonsäure (3-Carboxy-5-methyl-isoxazol)	Dr. Biere Dept. Arzneimittelchemie Schering AG, Berlin/ Bergkamen	NaOH	+	
Theophyllin, krist. 1,3,7-Trimethylxanthin	E. Merck AG Darmstadt	Lösung unter Erwärmen	+	+
Adrenalin-Hydrochlorid 1-(3',4'-Dioxyphenyl)-2-(N-methyl)-aminoäthanol, Bitartrat	Farbwerke Hoechst AG Frankfurt /Main		+	
Isoprenalin-Sulfat (Isopropyluoradrenalin); 1-(3',4'-Dioxyphenyl)-2-(N-isopropyl-)aminoäthanol, Sulfat	C.H. Boehringer Sohn Ingelheim/Rhein		+	
Kö 592 (Methylphenoxyisopropylamino-propanol-Hydrochlorid); 1-(m-Tolyl-oxy)-3-(N-isopropyl)-amino-propanol, Hydrochlorid	C.H. Boehringer Sohn Ingelheim/Rhein		+	

Fortsetzung Tabelle 1

Substanzbezeichnung Generic name/ Code-Bezeichnung; Chemischer Name	Herkunft (Hersteller des Wirkstoffes)	Besonderheiten bei der Lösung NaOH=Zusatz einer äquimolaren NaOH-Menge Aethanol=Anlösen in Aethanol	Applikationsart in vitro	in vivo:i.v.
Phentolamin - Hydrochlorid; 2-(N-p-tolyl-n-m-hydroxyphenyl-aminomethyl)-imidazolin, Hydrochlorid	CIBA AG Basel, Schweiz		+	
Rinderinsulin a. kommerzielles Altinsulin (Insulin 'Hoechst'(R)) b. hochgereinigtes Rinderinsulin	a. Farbwerke Hoechst AG Frankfurt/Main b. Dr.K.Lübke, Dept.Allg. Biochemie, Schering AG, Berlin/Bergkamen		+	+
Glucagon-Hydrochlorid	Eli Lilly GmbH Gießen		+	+
Adenosin	Boehringer Mannheim GmbH Mannheim-Waldhof		+	
ZK 2o 242 ('' IPA''); N^6-Isopentenyladenosin	Dr. Vorbrüggen Dept.Allg.Synthetische Chemie, Schering AG, Berlin/Bergkamen		+	

Fortsetzung Tabelle 1

Substanzbezeichnung Generic name/ Code-Bezeichnung; Chemischer Name	Herkunft (Hersteller des Wirkstoffes)	Besonderheiten bei der Lösung NaOH=Zusatz einer äquimolaren NaOH-Menge Aethanol=Anlösen in Aethanol	Applikationsart in vitro	 in vivo:i.v.
ZK 5o 897 (''trans-Chlor-IPA'') trans-6-[3-Chlorbuten-(2')-yl-(1')-amino]-nebularin	Dr. Vorbrüggen Dept.Allg. Synthetische Chemie, Schering AG, Berlin/Bergkamen		+	
ADP; Adenosin-5'-diphosphat, tri-Natriumsalz	Boehringer Mannheim GmbH Mannheim-Waldhof		+	
Dibutyryl-3',5'-AMP; N^6-2'-O-Dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphat, cyclisch, Natriumsalz	Boehringer Mannheim GmbH Mannheim-Waldhof		+	
3',5'-GMP; Guanosin-3',5'-monophosphat, cyclisch, mono-Natriumsalz	Boehringer Mannheim GmbH Mannheim-Waldhof		+	
3',5'-IMP; Inosin-3',5'-monophosphorsäure, cyclisch	Boehringer Mannheim GmbH Mannheim-Waldhof		+	

Fortsetzung Tabelle 1

Substanzbezeichnung Generic name/ Code-Bezeichnung; Chemischer Name	Herkunft (Hersteller des Wirkstoffes)	Besonderheiten bei der Lösung NaOH=Zusatz einer äquimolaren NaOH-Menge Aethanol=Anlösen in Aethanol	Applikationsart in vitro	 in vivo:i.v.
3',5'-UMP; Uridin-3',5'-monophosphat, cyclisch, Natriumsalz	Boehringer Mannheim GmbH Mannheim-Waldhof		+	
Acetylcholin-Chlorid	E. Merck AG Darmstadt		+	
Prostaglandin E_1 (PGE_1); (13E)-(8R, 11R, 12R, 15S)-11,15-Dihydroxy-9-oxo-prostensäure	Fa. Unilever Vlaardingen, Niederlande	Aethanol	+	
Prostaglandin E_2 (PGE_2); (5Z,13E)-(8R, 11R, 12R, 15S)-11,15-Dihydroxy-9-oxo-prostadiensäure	Pfizer, Inc. Groton, Conn., U.S.A.	Aethanol	+	
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$); (5Z,13E)-(8R, 9S, 11R, 12R, 15S)-9,11,15-Trihydroxy-prostadiensäure, Tris-Salz	Pfizer, Inc. Groton, Conn., U.S.A.	Aethanol	+	

Fortsetzung Tabelle 1

Substanzbezeichnung Generic name / Code-Bezeichnung; Chemischer Name	Herkunft (Hersteller des Wirkstoffes)	Besonderheiten bei der Lösung NaOH=Zusatz einer äquimolaren NaOH-Menge Aethanol=Anlösen in Aethanol	Applikationsart in vitro	 in vivo:i.v.
Äthyl-butyl-thio-barbitalum (Inactin(R)) 5-Aethyl-5-(1'-methyl-propyl)-2-thiobarbitursäure, Natriumsalz	Chemische Fabrik Promonta GmbH, Hamburg			i.p.

Wasserstoffperoxid, welches durch Peroxidase bei Anwesenheit eines Wasserstoffdonators in Wasser umgewandelt wird. Zugleich wird derfarblose Wasserstoffdonator (ABTS*) zu einer blaugrün gefärbten Verbindung oxidiert. Ihre Farbintensität kann bei einer Wellenlänge von 42o oder 436 mm photometrisch gemessen werden. Die Reaktionen verlaufen stöchiometrisch, so daß die entstandene Farbstoffmenge ein Maß für die umgesetzte Glucose ist (HUGGET und NIXON, 1957; WERNER, REY und WIELINGER, 197o).

Ausführung: o,1 ml Vollblut wurde mit 1 ml Uranylacetatlösung** enteiweißt. Nach Zentrifugation bei 3ooo Upm wurde der Überstand zur Glucosebestimmung mit der nach dem angegebenen Prinzip standardisierten GOD - Perid(R)- Methode der Firma Boehringer Mannheim GmbH eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte halbautomatisch mit einem Meßsystem der Firma Braun, Melsungen (Braun SysteMatik(R)mit Spektralphotometer PL 4 der Firma Zeiß, Oberkochen). Unter Berücksichtigung eines Leerwertes und eines Standards (entsprechend einer Blutzuckerkonzentration von loo mg/loo ml) wurde der Glucosegehalt der untersuchten Proben in der Dimension mg% angegeben.

2.4. Beeinflussung der Insulinsekretion (in vivo)

2.4.1. Versuchsanordnung

Als Maß für die ß-cytotrope Wirkung einiger Verbindungen wurde ihr Einfluß auf die Insulinkonzentration im Serum des Pfortaderblutes studiert. Die 18 Std nüchternen Versuchstiere wurden zunächst mit Inactin(R) (7o mg/kg, i.p.) narkotisiert. 15 min. später wurden die in o,9%iger NaCl-Lösung gelösten Testsubstanzen entweder allein oder zusammen mit 2 g/kg Glucose (4o%ige Glucoselösung) in einem Gesamtvolumen von lo ml/kg i.v. injiziert. Kontrollen erhielten gleiche Volumina Glucose- und Kochsalzlösung oder nur physiologische Kochsalzlösung (lo ml/kg). lo oder 15 min später wurde der Bauchraum eröffnet und die Pfortader mit einer schräg angeschliffenen, S-förmig gebogenen Kanüle punktiert, die mit einem PVC-Schlauch verbunden war. In dem auf diese Weise gewonnenen Blut wurde der Glucosegehalt und die Insulinkonzentration des Serums gemessen. Die Blutproben wurden hierzu 15 min bei 3ooo U/min zentrifugiert und die abpipettierten Seren bis zur Durchführung der Bestimmung bei - 2o°C aufbewahrt.

2.4.2. Insulinbestimmung

Die radioimmunologische Bestimmung dieses Hormons im Serum erfolgte nach den Angaben von MORGAN und LAZAROW (1962, 1963), sowie MORGAN, SORENSON und LAZAROW (1964).

---

* 2,2'-Azino-di[3-äthyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)]-diammoniumsalz

** 1,5 g Uranylacetat, 9,o g NaCl, aqua dest. ad looo,o

Prinzip: Der Nachweis von Insulin beruht auf der Bindung des Hormons an einen spezifischen Antikörper mit nachfolgender Trennung des gebundenen und des freien Insulins durch eine zweite Immunreaktion, bei der der Antigen - Antikörperkomplex durch ein gegen das Insulinantiserum gerichteten zweiten Antikörper präzipitiert wird. Hierzu ist eine definierte Menge Insulin-^{125}J erforderlich, das bei der Bindung an den Antikörper mit dem im Ansatz enthaltenen unmarkierten Insulin konkurriert. Bei steigender Konzentration an nicht radioaktivem Insulin wird weniger radioaktives Hormon gebunden und umgekehrt. Der Insulinantikörper wird aus Meerschweinchenserum nach Immunisierung der Tiere mit kristallinem Rinderinsulin gewonnen. Antiserum zur Präzipitation des Antigen - Antikörperkomplexes wird bei Kaninchen durch Immunisierung mit Meerschweinchenserum erzeugt.

Da Ratteninsulin mit Antikörpern reagiert, die gegen Rinderinsulin gerichtet sind, ist es möglich, dieses Hormon unter Verwendung von Rinderinsulin-^{125}J, einem Antirinderinsulinserum und kristallinem Rinderinsulin als Eichsubstanz zu bestimmen.

Ausführung: Die Insulinbestimmung erfolgte in Doppelwerten. Zu o,1 ml Serum wurden o,4 ml 5%iger Rinderserumalbuminboratpuffer[1] zugegeben. Danach wurden zunächst o,o5 ml Insulin-^{125}J-Lösung[2] (entsprechend 2,7 µE Insulin = 5 nCi ^{125}J) und anschließend o,1 ml Insulin - Antiserum[3] hinzupipettiert. In gleicher Weise wurden gleiche Volumina von Rinderinsulin - Eichwerten behandelt, deren Konzentrationen zwischen o und 512 µE/ml betrugen. Zur Ermittlung einer unspezifischen ^{125}J-Insulinbindung an Serumproteine wurden je 2 Puffer- und Serumleerwerte untersucht. Sie enthielten außer Antiinsulinserum die gleichen Bestandteile wie die anderen Proben. Alle Vorgänge liefen im Eisbad ab. Jede Probe wurde gut geschüttelt und anschließend 24 Stunden bei + 4°C inkubiert. Danach wurden (ebenfalls im Eisbad) o,o5 ml Antimeerschweinchenserum[4] und o,1 ml normales Meerschweinchenserum[5] hinzupipettiert. Die Proben wurden erneut geschüttelt und für weitere 16 bis 24 Stunden bei + 4°C aufbewahrt. Während dieser zweiten Inkubationsphase hatte sich ein Präzipitat gebildet, das den Insulin-Antiinsulin-Komplex enthielt; zur Abtrennung des freien Insulins wurden die Proben bei 3ooo Upm (15 min Zimmertemperatur) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Präzipitat mit o,5 ml 1%igem Rinderserumalbuminboratpuffer[6] gewaschen und erneut zentrifugiert.

---

1 8,25 g Borsäure, 2,7 g NaOH, Thimerosal (Merthiolat), 5o g Rinderserumalbumin (reinst, Behringwerke, Marburg/Lahn), aqua dest. ad looo,o, pH 7,4.

2 Rinderinsulin -^{125}J (o,1 µg = 2,7 mE, 5 µCi, Radiochemical Centre, Amersham, England), lofache Verdünnung mit 5%igem Rinderserumalbumin-Boratpuffer.

3 Antirinderinsulin-γ-Globulin vom Meerschweinchen (eigene Herstellung), Verdünnung 1:6ooo mit 5%igem Rinderserumalbumin-Boratpuffer unter Zusatz von 5,4% EDTA.

4 Präzipitierendes Antimeerschweinchenserum vom Kaninchen, eigene Herstellung, unverdünnt.

5 Normales Meerschweinchenserum, 1:2oo mit 5%igem Rinderserumalbuminboratpuffer verdünnt.

6 Wie 1, jedoch statt 5o g nur lo g Rinderserumalbumin.

Die Waschflüssigkeit wurde ebenfalls dekantiert und dem ersten Überstand hinzugefügt. In beiden Fraktionen (Präzipitat und Überstand) wurde die Radioaktivität in einem Auto -γ- Scintillationszähler der Firma Nuclear Chicago gemessen und die im Präzipitat enthaltene Radioaktivität als Prozentsatz der Gesamtaktivität errechnet. Aus den Ergebnissen der Eichwerte ergab sich auf semilogarithmischem mm-Papier eine Eichreihe, wobei der prozentuale Anteil der gebundenen Aktivität linear auf der Ordinate und die eingesetzten Insulinkonzentrationen logarithmisch auf der Abszisse eingetragen wurden. Von dieser Eichkurve wurde der Insulingehalt der Versuchsproben abgelesen und nach Berücksichtigung der Verdünnung in µE/ml Serum angegeben.

2.5. Beeinflussung der durch ADP induzierten Thrombocytenaggregation (in vitro)

2.5.1. Gewinnung von TRP

Die Versuchstiere wurden mit Inactin(R) (7o mg/kg i.p.) narkotisiert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Aorta an der Aufzweigung in die beiden Beckenarterien punktiert. 9 ml Blut wurden in eine Plastikspritze, in der sich 1 ml 3,8%ige Natriumcitratlösung befanden, gesaugt. Nach Mischung wurde das Citratblut in ein Plastikzentrifugenröhrchen überführt und bei 15o·g(R) 2o min lang zentrifugiert (Raumtemperatur; Zentrifuge Rottixa(R), Fa. Hettich). Dabei sedimentierten die Erythrocyten und Leukocyten, der trübe Überstand enthielt die Thrombocyten. Das thrombocytenreiche Plasma (= TRP) mehrerer Tiere wurde mit silikonierten Glaspipetten abgenommen und in ein Plastikgefäß pipettiert. Dieser TRP-Pool wurde bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.5.2. Bestimmung der Thrombocytenkonzentration im TRP mit dem Coulter-Counter

Die Thrombocytenzählung erfolgte mit dem Coulter Counter (R), Modell ZB I (Firma Coulter Electronics GmbH).

Prinzip: Teilchen, die sich in einer Elektrolytlösung befinden, können registriert werden, wenn sie in einer gewissen Zeit durch eine Öffnung bekannter Größe strömen. Passieren die Partikel die Öffnung und verdrängen dabei ein äquivalentes Volumen der Elektrolytlösung, so ändert sich der Widerstand eines Stromkreises und entsprechend Spannung und Stromstärke. Die Größe dieser Änderung ist direkt proportional der volumetrischen Größe der Teilchen. Die Anzahl der Änderungen bei einem bestimmten Durchfluß ist proportional der Anzahl der durchgeströmten Partikel. Die meßbare Zellgröße liegt zwischen o,6 und 75 µm.

Zur Thrombocytenzählung wurden o,o5 ml TRP unter ständigem Rühren in 2o ml isotonische, partikelfreie NaCl-Lösung pipettiert.

Bei einer Öffnungsgröße von 5o µm wurde die Partikelzahl in einem Volumen von o,o5 ml gemessen. Unter der Berücksichtigung der TRP-Verdünnung wurde daraus die Thrombocytenzahl pro ml TRP errechnet. Sie betrug bei den durchgeführten Experimenten im Mittel $3,3 \cdot 10^8$ Zellen/ml*.

2.5.3. Messung der Thrombocytenaggregation

Die Beeinflussung der durch ADP induzierten Thrombocytenaggregation wurde in vitro nach der von BORN und CROSS (1963) angegebenen turbidimetrischen Methode studiert. Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Registrierung der optischen Dichte des TRP unter ständigem Rühren. Nach Zusatz eines Stimulators der Thrombocytenaggregation, z.B. ADP, nimmt die optische Dichte des TRP infolge der Thrombocytenverklebung ab. Nach Erreichen eines Minimums steigt die Absorption wieder an, da bei Abbau des zugesetzten und bei der Aggregation freigesetzten, endogenen Adenosinphosphats durch die Thrombocyten eine Desaggregation auftritt. Nach Registrierung der Ausgangslage wurde dem Meßansatz 2o µl ADP-Lösung (Endkonzentration in der Küvette: $2,5 \cdot 10^{-6}$ M) zugesetzt und die Absorptionsabnahme bis zum Erreichen des Maximums verfolgt. Die Differenz zwischen Ausgangswert und Maximum ergab bei Ansätzen ohne Prüfsubstanz den Effekt von ADP unter Kontrollbedingungen. Während des Versuchsablaufes ergaben sich Schwankungen in der absoluten Größe des Kontrollwertes. Zur Beurteilung von Substanzeffekten wurden deshalb je vor und nach 2 - 3 Messungen bei Zusatz von Prüfsubstanzen Kontrollwerte registriert. Die durch ADP induzierte Abnahme der Absorption bei Anwesenheit einer Substanz wurde jeweils in Prozent des Mittelwertes der Absorptionsabnahmen der beiden benachbarten Kontrollbestimmungen angegeben. Auf den Tabellen wurden diese Werte als ''Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes)'' bezeichnet. Bei einer Hemmung der durch ADP induzierten Aggregation liegt der Prozentsatz unter loo, bei einer Steigerung der Aggregation über loo.

Alle Testsubstanzen wurden i.a. in mindestens 3 Konzentrationen untersucht. Die Anzahl der Meßwerte pro Konzentration lag zwischen 3 und 5.

Zur Registrierung der Absorptionsänderung des TRP wurde ein für diese Zwecke umgebautes Spektralphotometer der Firma Beckmann (Modell DB) verwendet. Es war mit einem Motor versehen, der einen von oben in die Meßküvette hineinragenden Propeller antrieb. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 6oo nm in silikonierten Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke bei 25°C unter ständigem Rühren mit konstanter Geschwindigkeit. Die Veränderungen der optischen Dichte wurden mit einem die Absorptionsänderungen linear aufzeichnenden Schreiber der Firma Beckmann registriert. Die Referenzküvette enthielt eine violette Farblösung, deren Konzentration so gewählt wurde, daß

---

* $\bar{x}$: $3,29 \cdot 10^8$, S=o,11 $\cdot 10^8$, n=2o

die absolute Absorption der Meßküvette am oberen Rand des Meßbereiches (Extinktion: 1,o) lag. Wegen des hohen Thrombocytengehaltes im Rattenblut wurde das TRP mit modifizierter Tyrodelösung[1] verdünnt (1,5 ml TRP + 1,o ml Tyrode). Die Prüfsubstanzen wurden in o,9%iger Kochsalzlösung gelöst und dem Meßansatz in einem Volumen von o,5 ml in Endkonzentrationen bis zu maximal 10^{-2} M zugesetzt. Kontrollansätzen wurden o,5 ml o,9%iger NaCl-Lösung zugefügt. Das Gesamtvolumen in der Meßküvette betrug 3,o2 ml.

2.6. Beeinflussung der cAMP-Konzentration

2.6.1. Bestimmung in der Leber (in vivo)

Eine Beeinflussung des cAMP-Gehaltes der Leber durch die untersuchten Substanzen wurde z.T. im Rahmen der unter 2.4.1. angegebenen Experimente studiert. In Inactin(R)-Narkose (7o mg/kg, i.p., 15 min) wurden den Ratten die Testsubstanzen i.v. injiziert. Die Injektionsvolumina betrugen 5 ml/kg, bei kombinierter Gabe von zwei Substanzen 1o ml/kg. Kontrollen erhielten gleiche Volumina des Lösungsmittels (o,9%ige NaCl-Lösung), 5 oder 1o min später wurden Leberproben zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes entnommen. Hierzu wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle im Gefrierstopverfahren ein Teil des rechten Leberlappens mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Gewebefaßzange gequetscht, abgetrennt, in flüssigem N_2 mit einem Mörser zerkleinert und bei -2o°C im Gefrierschrank bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Hierbei wurden zunächst 15o mg des gefrorenen Gewebes zur Eiweißdenaturierung und zum Aufschluß der Leberzellen in 1 ml eisgekühlter o,5 M Perchlorsäure 1 min lang im Eisbad homogenisiert (Glashomogenisator Duall(R), Kontes Glass Comp., Rührmotor RM 22 der Fa. Janke und Kunkel). Das Homogenat wurde in einer Kühlzentrifuge (Modell Sorvall, Rotor SM 24) bei 3ooo · g (o°C) für 1o min. zentrifugiert. Vom Überstand wurden 8oo µl abpipettiert und mit 115o µl o,5 M KOH neutralisiert. Nach guter Durchmischung wurde das entstandene Sediment (Kaliumperchlorat) z.T. wiederholt bei 3ooo · g in der Kühlzentrifuge für 1o min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und zur cAMP-Bestimmung eingesetzt. Bei Zusatz von exogenem cAMP zu den Leberproben wurden nach der Extraktion mit Perchlorsäure im neutralisierten Überstand durchschnittlich 92,5% der eingesetzten cAMP-Menge wiedergefunden (s. Tabelle 4).

---

1 modifizierte Tyrode-Lösung: o,8 g NaCl
o,1 g Glucose
o,1 g $NaHCO_3$
o,o2 g $CaCl_2$
o,oo5 g $MgCl_2$
o,o2 g KCl
o,oo5 g NaH_2PO_4
Aqua dest. ad 1oo,o

2.6.2. Bestimmung im Serum (in vivo)

Adenosin-3',5'-monophosphat (A-3',5'-MP, cAMP) wird als intracellulärer Überträgerstoff hormonaler Wirkungen zwar innerhalb der Zellen synthetisiert und abgebaut, durchdringt aber in geringem Maße auch die Zellmembran und kann im Extrazellulärraum bzw. Serum und Urin nachgewiesen werden (RABINOWITZ und KATZ, 1973). Veränderungen der cAMP-Konzentration im Serum (und Urin) reflektieren daher in gewisser Weise Schwankungen des absolut höheren Nucleotidgehaltes in den Körperzellen. Untersuchungen über eine Beeinflussung der cAMP-Konzentration im Serum durch Sulfonylharnstoffe wurden im Zusammenhang mit den unter 2.4.1. beschriebenen Versuchen zur Insulinsekretion durchgeführt. Proben des hierbei gewonnenen Serums wurden bis zur Aufarbeitung bei -2o°C aufbewahrt.

Zur Extraktion des cyclischen Nucleotids wurden o,25 ml Serum mit o,5 ml absolutem Aethanol versetzt. Nach guter Durchmischung wurde der Eiweißniederschlag 2o min lang in einer Kühlzentrifuge (Sorvall, Rotor SM 24)bei 1oooo · g (o°C)abzentrifugiert. Vom Überstand wurden o,5 ml unter strömendem Stickstoff in einem Wasserbad bei 4o°C bis zur Trockenheit eingeengt. Der Rückstand wurde in o,1 ml o,1 M Trispuffer[1] aufgenommen und zur cAMP-Bestimmung eingesetzt. Bei der Extraktion von Serumproben mit exogen zugesetztem radioaktivem (^{3}H) oder nicht radioaktivem cAMP wurden im Mittel 9o% des cyclischen Nucleotids wiedergefunden (s. Tabelle 4).

Um auszuschließen, daß eine Beeinflussung der cAMP-Bestimmung durch den Elektrolytgehalt der Serumproben zu fehlerhaften Ergebnissen führt, wurden Lösungen annähernd gleicher Elektrolytkonzentration (modifizierte Tyrodelösung, s. 2.5.3.) in gleicher Weise wie die Serumproben behandelt und entsprechende Volumina des in Tris-Puffer aufgenommenen Rückstandes den cAMP-Eichwerten zugesetzt. Die Ergebnisse der Eichwertmessungen wurden durch diesen Zusatz nur geringfügig oder gar nicht beeinflußt.

2.6.3. Bestimmung in Thrombocyten (in vitro)

2,5 ml TRP wurden nach Zusatz der in o,5 ml physiologischer NaCl-Lösung gelösten Testsubstanzen (Kontrollansatz: nur o,9%ige Kochsalzlösung) unter ständigem Rühren 3 min lang

---

1 Tris-Puffer: o,1 mol Tris (Trishydroxymethyl-aminomethan)
8 mmol Theophyllin
6 mmol 2-Mercaptoaethanol
Aqua dest. ad looo,o
Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mit konz. HCl

inkubiert. Dieses Verfahren entsprach dem zeitlichen Ablauf bei der Messung der Thrombocytenaggregation. Danach wurden sofort 2,5 ml dieser Inkubationsproben zur Eiweißfällung mit 5 ml absolutem Aethanol versetzt und anschließend mit einem Ultra-Turrax(R) (Fa. Janke und Kunkel, Typ 18/2N, 2o ooo U/min) zur Extraktion des cAMP aus den Thrombocyten im Eisbad homogenisiert. Der Eiweißniederschlag wurde 2o min lang in einer Kühlzentrifuge (Sorvall, Rotor SM 24) bei 45oo · g (°C) abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 6 ml unter einem Stickstoffgebläse in einem Wasserbad bei 4o°C bis zur Trockenheit eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 ml o,1 M Tris-Puffer[1] aufgenommen, kräftig mit einem Whirlmix(R) (Firma Cenco) durchmischt, um auch an der Glaswand haftende Teile mit zu erfassen, und zur cAMP-Bestimmung eingesetzt. Nach Zusatz von ^{3}H-cAMP zu TRP-Proben wurden im Extrakt loo% der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden (s. Tabelle 4).

2.6.4. cAMP-Messung

Die cAMP-Bestimmung erfolgte nach den Grundzügen des von GILMAN (1972) angegebenen Proteinbindungstests in der von BROWN, ALBANO, EKINS und SGHERZI (1972) publizierten Modifikation. Hierbei wird als cAMP-Bindungsprotein eine aus Rindernebennierenrinde gewonnene Rohfraktion verwendet, die das natürliche Receptorprotein des cyclischen Nucleotids (regulatorische Untereinheit der Proteinkinase) enthält.

2.6.4.1. Herstellung von cAMP-Bindungsprotein

Die Gewinnung des Bindungsproteins erfolgte nach den Angaben der zitierten Autoren. Rindernebennieren wurden auf dem Schlachthof sofort nach der Tötung der Tiere entnommen und in Dewargefäßen auf Eis gekühlt. Fascien und umgebendes Organfett wurden abpräpariert, Nebennierenrinde und -mark voneinander getrennt. Das Rindengewebe wurde von der Bindegewebskapsel abgeschabt und in einem Eisbad mit dem 1,5 fachen Volumen HCl-Tris-Saccharose-Puffer[2] homogenisiert (Teflon-Homogenisator nach Potter-Elvehjem, Modell Potter S der Firma Braun, Melsungen, mit Rührmotor der Fa. Janke und Kunkel). Das Homogenat wurde in einer Kühlzentrifuge (Sorvall, Typ RC 2-B, Rotor SS 34) bei + 4°C und 2ooo g für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und erneut bei 5ooo · g für 15 min. zentrifugiert. Der hierbei gewonnene Überstand enthielt das Bindungsprotein und wurde ohne weitere Auftrennung für die cAMP-Bestimmung verwendet. Die Präparation ist für 6 Monate stabil

---

1 Tris-Puffer: loo mmol Trishydroxymethyl-aminomethan
8 mmol Theophyllin
6 mmol 2-Mercaptoaethanol
Aqua dest. ad looo,o
Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mit konzentrierter HCl.

2 HCl-Tris-Saccharose-Puffer: o,25 mol Saccharose
5o mmol Trishydroxymethyl-aminomethan
25 mmol KCl
5 mmol $MgCl_2$
Aqua dest. ad 1ooo,o
Einstellung des pH-Wertes mit HCl auf 7,4.

und wurde in Proben à 4 ml bei -2o°C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Durchführung einer Messung wurde eine Probe aufgetaut und mit o,1 M Tris-Puffer (s. 2.6.2.) auf das 2,5 fache Volumen verdünnt. Bei dieser Konzentration an Bindungsprotein wurden unter den üblichen Meßbedingungen (s. 2.6.4.2.) bei alleinigem Zusatz von ^{3}H-cAMP zwischen 5o und 6o% der Radioaktivität gebunden.

2.6.4.2. Durchführung der Messung

Prinzip: Der Nachweis von cAMP beruht auf der spezifischen Bindung des cyclischen Nucleotids an sein natürliches Rezeptorprotein. Wie bei einem Radioimmunoassay wird die Bindung einer definierten Menge von radioaktiv markiertem (^{3}H-)cAMP an dieses Protein durch Zusatz von unmarkiertem cAMP herabgesetzt. Der prozentuale Anteil der gebundenen Radioaktivität ist damit ein Maß für die Gesamtmenge des Nucleotids im Ansatz. Die Trennung von freiem und gebundenem cAMP erfolgt durch Adsorption des freien Anteils an Aktivkohle.

Ausführung: Mit leichten Modifikationen wurde die Bestimmung nach den Angaben von BROWN, ALBANO, EKINS und SGHERZI (1972) durchgeführt.

Als Eichsubstanz diente Adenosin-3',5'-monophosphorsäure (cyclisch, kristalline freie Säure) der Fa. Boehringer Mannheim GmbH. Die Substanz wurde in o,1 M Tris-Puffer (s. 2.6.2. und 2.6.3.) gelöst und in der Weise verdünnt, daß Eichlösungen folgender Konzentrationen zur Verfügung standen: O (Leerwert) - o,625 - 1,25 - 2,5 - 5 - 1o - 2o - 4o - 8o - 16o - 32o - 64o - 128o pmol/o,1 ml. Die Einwaage der Stammlösung betrug 1,39 mg cAMP (freie Säure)/1oo ml Tris-Puffer. Diese Lösung wurde in Proben zu 1 ml bei -2o°C aufbewahrt. Durch Zugabe von 2,125 ml o,1 M Tris-Puffer zu 1 ml Stammlösung wurde nach dem Auftauen jeweils vor einem Versuch hieraus die oberste Eichkonzentration hergestellt und entsprechend den übrigen Eichpunkten weiter verdünnt.

^{3}H-cAMP wurde vom Radiochemical Centre, Amersham (England), bezogen. Die spezifische Aktivität betrug 14,2 m Ci/µmol (= 5oo µCi/1 ml aethanolische Lösung). Durch Verdünnung mit Tris-Puffer (1:66o, 1o µl ad 6,6 ml) wurde vor jedem Versuch eine Gebrauchslösung hergestellt, die in o,o5 ml 2,67 pmol cAMP (= 37,9 nCi ^{3}H) enthielt. Die das cAMP-Bindungsprotein enthaltende Stammlösung (s. 2.6.4.1.) wurde mit Tris-Puffer im Verhältnis 1 ad 2,5 verdünnt.

Im Eisbad wurden in den Reaktionsgefäßen zunächst 1oo µl o,1 M Tris-Puffer vorgelegt. Anschließend wurden in der angegebenen Reihenfolge folgende Volumina hinzupipettiert: 1oo µl Eichlösung (= o - 128o pmol cAMP) oder 1oo µl in Tris-Puffer aufgenommener Serum- oder Gewebe-(Thrombocyten-, Leber-)extrakt, 5o µl ^{3}H-cAMP-Lösung, 1oo µl cAMP-Bindungsprotein in Tris Puffer. Zur Ermittlung

von Puffer- und Gewebeleerwerten dienten Proben, denen statt Bindungsprotein lediglich 1oo µl Tris-Puffer zugesetzt wurden. Alle Werte wurden als Doppelbestimmung, die Nullwerte der Eichkurve als Vierfachbestimmung angesetzt. Nach kräftigem Umschütteln wurden je 5o µl entnommen und zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität in Gefäße zur Flüssigkeitsszintillationszählung (Fa. Packard) pipettiert, in denen sich bereits 1o ml Scintillationsflüssigkeit (Instagel(R), Fa. Packard) befanden. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend 9o min bei +4°C (Kühlschrank) inkubiert. Danach wurden im Eisbad 1oo µl einer 1o% Kohlesuspension (Norit SX 1, Norit Clydesdale, Glasgow, Schottland) in o,1 M Tris-Puffer mit Zusatz von 2% Rinderserumalbumin (reinst, Behringwerke, Marburg/Lahn) hinzupipettiert. Nach kräftigem Schütteln (Whirlmix(R), Fa. Cenco) wurden die Proben in möglichst gleichem zeitlichem Abstand 15 min lang bei 12oo · g in einer Kühlzentrifuge (SORVALL, Typ RC2B, Rotor SM 24) bei +4°C zentrifugiert und dadurch das an die Kohle adsorbierte freie cAMP vom gebundenen Nucleotid getrennt. Zur Ermittlung dieses gebundenen Anteils wurden 1oo µl Überstand entnommen und in gleicher Weise wie bereits beschrieben zur Radioaktivitätsbestimmung eingesetzt. Die Messung der ^{3}H-Aktivität erfolgte in einem Liquid Scintillation Spektrometer (Modell Tricarb 338o) der Fa. Packard.

Aus den Meßwerten wurde der Anteil des gebundenen ^{3}H-cAMP an der Gesamtradioaktivität unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Zählvolumina (5o bzw. 1oo µl) nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{cpm}\,[\text{Meßwert gebundene Aktivität} - \text{Background}]\cdot 4oo}{\text{cpm}\,[\text{Meßwert Gesamtaktivität} - \text{Background}]\cdot 6} = \%\ \text{gebundenes cAMP}$$

Aus den Ergebnissen der Eichwertbestimmungen wurde auf halblogarithmischem Papier eine Eichkurve gezeichnet, wobei die eingesetzte cAMP-Menge auf der Abszisse (logarithmischer Maßstab) gegenüber dem Prozentsatz der gebundenen Radioaktivität auf der Ordinate (linearer Maßstab) aufgetragen wurde. Von dieser Kurve wurde der cAMP-Gehalt der Versuchsproben abgelesen und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren und eingesetzten Gewebe-, TRP- oder Serummengen in die Dimensionen nmol/g Feuchtgewicht (Leber) bzw. pmol/ml Serum oder TRP umgerechnet.

Eine zwischen Eich- und Meßproben differierende unspezifische Bindung von ^{3}H-cAMP an das im Ansatz enthaltene Rinderserumalbumin oder eine verschiedenartige Adsorption an die Aktivkohle brauchte bei der Auswertung nicht berücksichtigt zu werden, da in dieser Hinsicht keine Unterschiede festzustellen waren. So wurden bei Proben ohne Zusatz von Bindungsprotein unspezifische Bindungen von o,92 und o,94% gemessen, wobei der Ansatz in einem Fall in Tris-Puffer aufgenommenen Leberextrakt, im anderen dagegen nur Tris-Puffer enthielt.

2.6.4.3. Spezifität der Methode

Die Bindung von cAMP an sein natürliches Receptorprotein ist sehr spezifisch. Bei der unter 2.6.4.2. angegebenen semilogarithmischen Darstellung der Abhängigkeit von ^{3}H-cAMP-Bindung (2,7pmol/Ansatz) und Gehalt an nicht radioaktivem Nucleotid ergab sich zwischen etwa 2 und loo pmol eine lineare Konzentrationsbindungsabhängigkeit. Verschiedene cAMP-Analoga zeigten zwar grundsätzlich eine 'Kreuzreaktion' mit dem cAMP-Bindungsprotein, sie war aber nur bei Zusatz hoher Konzentrationen nachweisbar. Inosin-3',5'-monophosphat (cIMP) verdrängte das markierte cAMP vom Receptorprotein erst in lofach höherer Konzentration als das cyclische Adenosinderivat. Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), das zweite natürliche cyclische Nucleosid-3',5'-monophosphat, sowie Dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphat (DBcAMP) und die in der Natur bisher nicht nachgewiesenen Cyclophosphate von Cytidin und Uridin (cCMP und cUMP) übten diesen Effekt sogar erst in um zwei Zehnerpotenzen höheren Konzentrationen aus. Desoxythymidin-3',5'-monophosphat (c-dTMP) sowie andere Nucleotide und Nucleoside reagiertennur ganz gering oder überhaupt nicht mit dem Receptorprotein. Keine Verminderung der Bindung von 2,7 pmol ^{3}H-cAMP/Ansatz wurde durch Konzentrationen bis zu 2o,5 (a) oder 82 (b) nmol/Ansatz folgender Substanzen beobachtet: (a) Hypoxanthin, Guanosin, Uracil; (b) Adenin, Xanthin, Adenosin, Inosin, Xanthosin, Uridin, d-Thymidin, Cytidin, 3'-AMP, 5'-AMP, 2',3'-AMP, 5'-ADP, 5'-ATP, 5'-GMP, 2',3'-GMP, 5'-GTP, 5'-IMP, 2',3'-CMP (LOSERT, 1973).

Einige der in der vorliegenden Studie untersuchten Testsubstanzen wurden ebenfalls auf eine Reaktion mit dem cAMP-Receptorprotein geprüft. Mit Ausnahme der obersten, unter den gewählten experimentellen Bedingungen sonst nicht erreichten Tolbutamidkonzentration ($5 \cdot 10^{-3}$M) hatten die untersuchten Verbindungen (Theophyllin, Tolbutamid, Glibenclamid, Glisoxepid und Acetylsalicylsäure) in Konzentrationen bis 10^{-3}M oder darüber keine Herabsetzung der ^{3}H-cAMP-Bindung zur Folge, die den Effekt von 1,25 pmol cAMP übertrafen. Diese Konzentration des cyclischen Nucleotids liegt noch unterhalb des linearen Teils der Konzentrationsbindungskurve und damit des für die cAMP-Bestimmung geeigneten Bereichs (Tabelle 2).

Auch der ohne Zusatz von Bindungsprotein als unspezifische Bindung von ^{3}H-cAMP imponierende Anteil der Gesamtradioaktivität unterschied sich bei Zusatz verschiedener Testsubstanzen in Konzentrationen bis $2,5 \cdot 10^{-3}$M nicht von den Werten, die in Kontrollansätzen gemessen wurden. Nur bei einem $5 \cdot 10^{-3}$M Gehalt von Glisoxepid, Indomethacin und ZK 28 2oo lag der nicht an Aktivkohle adsorbierte Prozentsatz der Radioaktivität höher, möglicherweise aufgrund einer mit dem ^{3}H-cAMP konkurrierenden Adsorption der drei Verbindungen (Tabelle 3).

Tabelle 2: Einfluß der Testsubstanzen auf die spezifische Bindung von cAMP-^{3}H an das Bindungsprotein im Radioreceptorassay (Gegenüberstellung der Verdrängung von cAMP-^{3}H aus der Bindung an das spezifische Bindungsprotein durch cAMP und die Testsubstanzen)

Zusatz von cAMP		Zusatz der Testsubstanzen		
cAMP-Konzentr. (pmol/Ansatz)	gebundene Radioaktivität (% der Gesamtaktivität) $\bar{x} \pm s_x$, n=4 (8)	Testsubstanz	Konzentration [M]	gebundene Radioaktivität (% der Gesamtaktivität) $\bar{x}$, n=2
o	63,6 ± 2,2 (8)	Tolbutamid	$1o^{-4}$	58,o
o,625	62,3 ± 4,4		$5 \cdot 1o^{-4}$	59,2
1,25	56,1 ± 1,4		$1o^{-3}$	62,o
2,5	52,o ± 1,4		$5 \cdot 1o^{-3}$	55,4
5	41,3 ± 2,7	Glisoxepid	$1o^{-5}$	62,8
1o	34,7 ± 1,5		$5 \cdot 1o^{-5}$	62,9
2o	26,8 ± 1,1		$1o^{-4}$	59,1
4o	17,9 ± 1,o		$5 \cdot 1o^{-4}$	62,3
8o	11,3 ± o,6		$1o^{-3}$	6o,2
16o	7,8 ± o,3	Glibenclamid	$1o^{-7}$	6o,5
32o	5,3 ± o,2		$1o^{-5}$	58,8
64o	3,3 ± o,3		$1o^{-4}$	56,6
128o	2,7 ± o,3		$1o^{-3}$	63,6
		Acetylsalicylsäure	$5 \cdot 1o^{-4}$	63,1
			$1o^{-3}$	59,9
			$5 \cdot 1o^{-3}$	6o,6
		Theophyllin	$1o^{-3}$	59,o

Tabelle 3: Einfluß der Testsubstanzen auf die unspezifische Bindung von cAMP-^{3}H im Proteinbindungstest für cAMP

[Bestimmung des nicht an Aktivkohle adsorbierten Anteils der Gesamtradioaktivität ohne Zusatz von Bindungsprotein]

% gebundene Radioaktivität [$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n=5]

Substanz		-	$0{,}1 \cdot 10^{-3}$ M	$0{,}5 \cdot 10^{-3}$ M	$1{,}0 \cdot 10^{-3}$ M	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$ M	$5{,}0 \cdot 10^{-3}$ M
ohne Zusatz	1. Versuch	1,14±0,17±0,08	-	-	-	-	-
	2. Versuch	1,36±0,15±0,07	-	-	-	-	-
Tolbutamid		-	-	1,13±0,08±0,04	-	-	1,48±0,49±0,22
Glisoxepid		-	-	1,19±0,08±0,04	1,14±0,14±0,06	1,18±0,06±0,03	16,58±0,98±0,44
Glibenclamid		-	1,41±0,24±0,11	-	1,15±0,09±0,04	-	-
ZK 28 200		-	-	1,25±0,12±0,05	1,28±0,11±0,05	1,70±0,30±0,13	7,18±3,59±1,60
Theophyllin		-	-	1,52±0,17±0,08	-	-	1,23±0,19±0,09
Acetylsalicylsäure		-	-	1,04±0,05±0,02	-	-	1,14±0,12±0,06
Indomethacin		-	-	1,18±0,09±0,04	1,22±0,08±0,03	1,38±0,15±0,07	8,31±4,34±1,94

2.6.4.4. Zuverlässigkeit der Methode

Bei der Beschreibung der Extraktion des cyclischen Nucleotids aus Leber-, TRP- und Serumproben wurde bereits darauf hingewiesen, daß hierbei zwischen 9o und loo% vorher zugesetzter cAMP-Mengen wiedergefunden wurden. In der Tabelle 4 sind die Ergebnisse der verschiedenen Experimente dargestellt, die mit Zusatz von radioaktivem oder nicht radioaktivem cAMP durchgeführt wurden. Aufgrund dieser quantitativen oder nahezu quantitativen Erfassung des Cyclonucleotidgehaltes der Versuchsproben wurde auf eine individuelle Berechnung der jeweiligen Meßausbeute (interner Standard)verzichtet.

Als Maß für die Zuverlässigkeit der Methode wurde außerdem geprüft, ob die literaturbekannte Steigerung der cAMP-Konzentration in der Leber durch Glucagon (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971) reproduziert werden kann. Bei zwei voneinander unabhängigen Versuchen zeigte sich 5 min nach i.v. Injektion des Hormons eine eindeutige, im Bereich zwischen o,1 und loo µg/kg dosisabhängige Zunahme des cAMP-Gehaltes von 1,5 auf mehr als 6o pmol/g Feuchtgewicht (Tabelle 5).

2.7. Beeinflussung der PGE_2-Konzentration in Thrombocyten (in vitro-Versuche mit TRP)

2.7.1. Versuchsanordnung

Der PGE_2-Gehalt in thrombocytenreichem Plasma wurde in vitro unter den gleichen Bedingungen wie die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation bestimmt.

Im Unterschied zu den üblichen Aggregationsmessungen wurden für diese Untersuchungen die Volumina der Inkubationsansätze verdoppelt [3 ml TRP, 2 ml Tyrode-Lösung (s.2.5.3.), 1 ml o,9%ige NaCl-Lösung mit oder ohne Zusatz der Testsubstanzen, o,o4 ml ADP-Lösung].

Nach einer dreiminütigen Inkubationszeit wurden zum Zeitpunkt des Aggregationsmaximums (stärkste Abnahme der optischen Dichte) 5 ml entnommen und mit lo ml einer Extraktionslösung aus 3 Teilen Methylal und 1 Teil Äthanol 1 min lang geschüttelt. Danach blieb der Ansatz 1 Std bei Raumtemperatur stehen und wurde anschließend in einer Laborzentrifuge (3ooo Upm) zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ abpipettiert und in einem Wasserbad bei +4o°C unter strömendem Stickstoff bis zur Trockenheit eingeengt. Der Rückstand wurde in 1,1 ml Isogel-Tris-Puffer[1] aufgenommen und für 12 - 18 Std gegen das gleiche

---

1 Isogel-Tris-Puffer: 1 Teil Lösung I + 9 Teile Lösung II

Lösung I: 12,1 g Tris
81,6 g NaCl
6,6 ml 1 N HCl
Aqua dest. ad 1ooo,o

Lösung II: 3,33 ml o,5 M $MgSO_4$-Lösung
1,5 ml o,1 M $CaCl_2$-Lösung
1,o g Gelatine
Aqua dest. ad 1ooo,o
(vor jeder Messung frisch angesetzt)

Tabelle 4: Wiedergefundene cAMP-Mengen bei Zusatz von nicht radioaktivem cAMP oder cAMP-^{3}H zu Leber-, TRP- und Serumproben

[Bestimmung im neutralisierten Perchlorsäureextrakt (Leber) bzw. in dem in Tris-Puffer aufgenommenen bis zur Trockenheit eingeengten aethanolischen Serum- oder TRP-Extrakt. Messung der Radioaktivität unter Berücksichtigung der Zählausbeute mit einem externen Standard; Messung des nichtradioaktiven cAMP mit dem beschriebenen Radioreceptorassay]

Leber		Leber [15o mg/Ansatz]	Thrombocytenreiches Plasma (TRP) [3 ml/Ansatz]	Serum [o,25 ml/Ansatz]
Zugesetzte Menge an nicht radioaktivem cAMP/Ansatz		1o,7 nmol	-	32 pmol
Wiedergefundene cAMP-Menge [in % der zugesetzten Menge]	$\bar{x}$	92,5	-	89,4
	s	± 6,o	-	±13,4
	$s_{\bar{x}}$	± 3,o	-	± 4,2
	(n)	(4)	-	(1o)
Zugesetzte cAMP-^{3}H-Aktivität		-	75 pmol = 1,o65 µCi	7 pmol =o,1 µCi
Wiedergefundene cAMP-^{3}H-Aktivität [in % der zugesetzten Menge]	$\bar{x}$	-	1oo,o	91,o
	s	-	± 2,2	± 1,2
	$s_{\bar{x}}$	-	± o,9	± o,5
	(n)	-	(6)	(5)

Tabelle 5: Einfluß von Glucagon auf den cAMP-Gehalt der Rattenleber

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n = 5(6) Tiere/Gruppe; Statistik (U-Test): -: $p > 0{,}05$, +: $p < 0{,}05$; Gewebsentnahme: 5 min. nach i.v. Injektion]

Dosis (µg/kg)	cAMP-Gehalt [nmol/g FG]	Signifikanz gegenüber
	1. Versuch	
0	1,41 ± 0,14	
0,1	1,91 ± 0,08 (6)	0 : +
1	4,21 ± 1,26	0,1 : +
10	41,1 ± 4,9	1 : +
	2. Versuch	
0	1,55 ± 0,07	
1	7,57 ± 1,87	0 : +
2	22,8 ± 6,2	1 : +
4	45,8 ± 4,5	2 : +
10	47,2 ± 2,7	2 : + 4 : -
100	62,1 ± 3,5	10 : +

Volumen dieses Puffers dialysiert. Nach dieser Zeit war ein Ausgleich der Prostaglandinkonzentration in beiden Dialysezellen erfolgt. Die in der Pufferzelle enthaltene Lösung (entsprechend 5o% der extrahierten Prostaglandinmenge) wurde zur PGE_2-Bestimmung eingesetzt.

2.7.2. PGE_2-Bestimmung

Die Messung des Prostaglandins erfolgte nach einem radioimmunologischen Doppelantikörperverfahren. Die hierzu notwendigen Reagenzien wurden in Form eines Test-Kits von der Fa. Clinical Assays, Inc., Cambridge, Mass., USA, bezogen. Die Grundlagen dieses Verfahrens wurden von JAFFEE, SMITH, NEWTON und PARKER (1971), LEVINE und van WUNAKIS (197o) sowie HICKLER (1968) beschrieben.

Prinzip: Die Bestimmung beruht auf der kompetetiven Bindung von ^{3}H-markiertem Prostaglandin und nicht radioaktivem Prostaglandin an einen Antikörper, der durch Immunisierung mit an Albumin gekoppeltem Prostaglandin B (PGB) erzeugt wurde. Da der Antikörper damit für PGB spezifisch ist, müssen E-Prostaglandine erst durch alkalische Behandlung in B-Prostaglandine (also PGE_2 in PGB_2) umgewandelt werden. F-Prostaglandine gehen dagegen nicht in PGB über, so daß hierdurch die Methode für E- (und B-) Prostaglandine spezifisch wird. Neben PGE_2 wird auch PGE_1 erfaßt; wie aus Untersuchungen an Humanthrombocyten hervorgeht, wurden dort jedoch nur PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ nachgewiesen (SMITH, INGERMAN, KOCSIS und SILVER, 1973).

Die Trennung von gebundenem und freiem Prostaglandin erfolgte durch Ausfällung des PG-Antikörpers mit einem präzipitierenden zweiten Antikörper.

Ausführung: Zu o,5 ml des Dialyseextraktes wurde o,o1 ml 1 N NaOH pipettiert und dadurch der pH-Wert auf 12 (bis 12,5) erhöht. Danach wurde das Dialysat für 5 min auf +1oo°C erhitzt. Diese Zeit reichte aus, um PGE vollständig in PGB umzuwandeln. Nach dem Abkühlen wurden Volumina von 2 x o,1 ml (Doppelbestimmung) in Gefäße überführt, in denen bereits 1 ml Isogel-Tris-Puffer vorgelegt worden war.

Als Eichsubstanz diente PGB_1. Mit dem gleichen Puffer wurden Eichlösungen hergestellt, deren Konzentrationen von 8 pg bis 2 ng/o,o5 ml reichten. Diese Volumina wurden (ebenfalls als Doppelwerte) in vorbereitete Gefäße pipettiert, die 1 ml Isogel-Tris-Puffer enthielten. Zur Ermittlung der maximalen Bindung von radioaktivem Prostaglandin in Abwesenheit nichtradioaktiver Substanz dienten zwei Nullwerte, denen statt PGB_1-Eichlösung o,o5 ml Puffer zugesetzt wurde. Radioaktives Prostaglandin (^{3}H-PGB_1* = 1o nCi/Ansatz) wurden in einem Volumen von o,o5 ml und anschließend PGB-Antiserum** von

---

* Spezifische Radioaktivität des markierten Prostaglandins und

** Verdünnungsgrad oder Titer der Seren wurden vom Hersteller nicht angegeben.

Kaninchen in einem Volumen von o,ol ml hinzugefügt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung von Radioaktivität an die im Ansatz enthaltenen Proteine wurden zwei Proben ohne PGB-Eichsubstanz und Antiserum vorbereitet. Alle Pipettierungsgänge erfolgten bei Zimmertemperatur, die Reagenzien wurden im Eisbad aufbewahrt. Nach guter Durchmischung wurden die Proben anschließend 6o min bei +37°C (Wasserbad) inkubiert. Danach wurden o,1 ml normales Kaninchenserum** und o,1 ml Antikaninchenserum** hinzupipettiert. Dieser zweite Antikörper stammte von Ziegen, die gegen Kaninchenserum immunisiert worden waren.

Nach erneuter Durchmischung wurden die Proben für 18-2o Std bei +4°C (Kühlschrank) aufbewahrt. Hierbei bildete sich ein Präzipitat, das den an Antikörper gebundenen Anteil des ^{3}H-Prostaglandins enthielt. Anschließend wurden die Gefäße in einer gekühlten Laborzentrifuge (Modell IV KS, Fa. Christ) für 3o min bei 16oo·g zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und verworfen, die in den Röhrchen verbliebenen Flüssigkeitsreste durch umgekehrtes Stehen auf Filterpapier abgesaugt. Die Präzipitate wurden mit je 1 ml o,1 N NaOH aufgelöst und diese Lösungen quantitativ in Gefäße zur Flüssigkeitsszintillationszählung überführt. Nach Zugabe von 1o ml Szintillationsflüssigkeit (Instagel (R), Fa. Packard) wurde der Radioaktivitätsgehalt der Proben mit einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Modell Tricarb(R) 3375, Fa. Packard) bestimmt.

Von den Meßwerten der Eich- und Versuchsproben wurden zunächst die für die unspezifische Bindung ermittelten Leerwerte abgezogen. Danach wurde die an Antikörper gebundene Aktivität aller Proben als Prozentsatz der ohne Zusatz von nicht radioaktivem Prostaglandin gemessenen maximalen ^{3}H-Bindung errechnet. Aus den hierbei für die Standardwerte ermittelten Daten wurde auf halblogarithmischem Papier eine Eichkurve gezeichnet (prozentual gebundene Aktivität linear, eingesetzte PG-Menge logarithmisch) von der der Prostaglandin B-(und damit PGE-)Gehalt der Meßproben abgelesen werden konnte. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungen, des Dialysefaktors und des eingesetzten TRP-Volumens wurde hieraus der PGE_2-Gehalt in pg/ml TRP berechnet.

2.8. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte ($\bar{x}$) sowie die Standardabweichungen der Einzelwerte (s_x) und der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$) nach folgenden Formeln berechnet:

1. $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$

2. $s_x = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x} \cdot \sum x}{n-1}}$

3. $s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{n}}$

Falls nicht anders angegeben, enthalten die Tabellen die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Zur Beurteilung signifikanter Unterschiede wurde nicht der üblicherweise verwendete t-Test benutzt, da in einigen Fällen die Varianzen (s^2) der verschiedenen Kollektive zu stark voneinander abwichen. Um zu vergleichbaren Resultaten zu gelangen, wurden daher bei allen Versuchen die Signifikanzen nach dem U-Test berechnet (WEBER, 1967). Hierbei handelt es sich um ein verteilungsunabhängiges Verfahren. Der Test wurde in Abhängigkeit von der Fragestellung (signifikanter Unterschied - signifikante Zu- oder Abnahme) zweiseitig oder einseitig ausgeführt.

Zur Ermittlung von Unterschieden in der relativen Wirksamkeit verschiedener Substanzen wurden mit Hilfe von Regressionsanalysen Dosiswirkungsgeraden berechnet (CAVALLI-SFORZA, 1969). Bei parallelem Verlauf dieser Geraden wurden die Differenzen zwischen ihnen ermittelt. Bei nicht parallelem Verlauf erfolgte der Wirksamkeitsvergleich auf der Basis der zu einer 50%igen Wirkung (Blutglucosesenkung auf 50% des Vorwertes oder Erniedrigung der Thrombocytenaggregation auf 50% des Kontrollwertes) notwendigen Dosen.

Alle Berechnungen wurden nach ausgearbeiteten Rechenprogrammen mit elektronischen Rechenmaschinen durchgeführt[1].

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der blutglucosesenkenden Wirkung verschiedener oraler Antidiabetica mit ihrem Einfluß auf die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation

3.1.1. Blutglucosesenkende Wirkung

Bei gefütterten Ratten wurde der blutglucosesenkende Effekt verschiedener Sulfonylharnstoffe und Sulfonylaminopyrimidine 1 Std nach i.v. Injektion der Substanzen untersucht. Unter ihnen befanden sich eine Reihe von Verbindungen, die in unterschiedlicher Dosierung zur Therapie des Erwachsenendiabetes verwendet werden [Tolbutamid, Glymidin-Natrium (Glykodiazin), Tolazamid, Gliclazid und Glibenclamid], einige bisher noch nicht eingeführte Prüfpräparate [Glisoxepid, Glidanil-Natrium, ZK 28 201 und ZK 28 200] und eine Verbindung [ZK 60 049], die nach den über sie existierenden Mitteilungen zwar die Thrombocytenaggregation, aber nicht die Blutglucose beeinflussen soll (BEREGI, HUGON, DESNOYERS und DUHAULT, 1973). Bei ZK 28 201 und ZK 28 200 handelt es sich um zwei isomere Sulfonylaminopyrimidine mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom, die sich chemisch nur durch ihre entgegengesetzte optische Aktivität, biologisch aber

---

1 Sektion Datenverarbeitung Forschung, Zentralbereich Physikochemie und Informetik, Schering AG, Berlin/Bergkamen

durch eine nach den bisher vorliegenden Befunden um mehr als eine Zehnerpotenz differierende blutzuckersenkende Wirksamkeit unterscheiden (RUFER, BIERE, AHRENS, LOGE und SCHRÖDER, 1974).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind als Absolutwerte und prozentuale Senkungen der Blutglucose gegenüber dem Ausgangswert auf der Tabelle 6 dargestellt. Soweit sich daraus parallele Dosiswirkungsgeraden ergaben, wurden die auf Tabelle 7 angegebenen Unterschiede in der relativen Wirksamkeit der Substanzen errechnet. Als weiteres Maß für Wirksamkeitsunterschiede wurden die auf Tabelle 8 vermerkten äquieffektiven Dosen ermittelt, die für eine 5o%ige Senkung der Blutglucose gegenüber dem Ausgangsniveau oder für eine Erniedrigung der Blutzuckerkonzentration auf 5o mg% (bei absolut etwa gleichem Vorwert) notwendig waren.

Man erkennt, daß alle Substanzen, einschließlich ZK 6o o49, zu einer dosisabhängigen Wirkung geführt haben. Wie zu erwarten war, zeigten sich jedoch große Unterschiede in der Höhe der hierzu erforderlichen Dosen. Zwischen der Verbindung mit der höchsten (ZK 28 2oo) und der Substanz mit der niedrigsten (ZK 6o o49) relativen Wirksamkeit betrug der Abstand der äquieffektiven Dosen etwa 4 Zehnerpotenzen. Verglichen mit Tolbutamid war ZK 6o o49 nur etwa ein Zehntel so wirksam, während mit Ausnahme von Glymidin-Natrium (annähernd gleiche relative Wirksamkeit) alle anderen Substanzen zur Erzielung des gleichen Effektes in 6-(Tolazamid)bis looofach (ZK 28 2oo) niedrigeren Dosen appliziert werden konnten. Von den beiden optischen Isomeren zeichnete sich die linksdrehende Verbindung (ZK 28 2oo) von ihrem rechtsdrehenden Antipoden (ZK 28 2o1) durch eine fast zwanzigfache höhere relative Wirksamkeit aus.

3.1.2. Hemmung der Thrombocytenaggregation

Da bei diesen in vitro-Versuchen nicht alle Verbindungen in einer Versuchsreihe miteinander verglichen werden konnten, wurden mehrere Experimente durchgeführt, wobei aber in jedem Fall Tolbutamid als Standardsubstanz mitgeprüft wurde.

Alle untersuchten ß-cytotropen Sulfonylharnstoffe und Sulfonylaminopyrimidine erwiesen sich als Hemmstoffe der durch ADP induzierten Thrombocytenaggregation. Das gleiche gilt für die beiden Biguanide Phenformin und 1-Butylbiguanid, deren antidiabetischer Effekt nicht auf einer Stimulation der Insulinsekretion beruht (LOSERT, SCHILLINGER, KRAAZ, LOGE und JAHN, 1972; s. dort weitere Literatur) (Tabelle 9). Die Effekte waren dosisabhängig und traten im Konzentrationsbereich zwischen minimal 10^{-4}M und maximal 10^{-2}M auf. Zum Ausschluß einer entgegengesetzten Wirkung bei niedrigerem Wirkstoffgehalt im Ansatz wurden mit zwei Substanzen (Tolbutamid und Glisoxepid) auch Versuche mit Konzentrationen zwischen 10^{-5}M und 10^{-4}M durchgeführt. Hierbei wurden keine um mehr als etwa 10% vom Kontrollwert abweichenden Ergebnisse erzielt (Tabelle 10).

Tabelle 6: Glucosekonzentration im Blut gefütterter Ratten nach i.v. Injektion verschiedener ß-cytotroper Substanzen
[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n = 4 Tiere/Gruppe (Kontrollen: 8 Tiere/Gruppe)]

Gruppe	Dosis (mg/kg)	Blutglucose		
		Vorwert	nach 1 Std.	
		(mg%)	(mg%)	(% Ausgangswert)
1. Versuchsreihe				
Kontrollen		96,4 ± 2,4	92,5 ± 2,2	96,1 ± 1,8
Tolbutamid	5	94,6 ± 1,1	91,5 ± 3,3	96,7 ± 2,5
	1o	86,1 ± 1,4	8o,9 ± 2,6	94,o ± 1,7
	2o	83,6 ± 1,6	66,3 ± 2,4	79,5 ± 4,1
	4o	91,2 ± 1,5	53,5 ± 2,5	58,8 ± 2,7
Glymidin-Natrium	5	92,8 ± 2,o	92,5 ± 2,6	1oo,o ± 4,o
	1o	96,9 ± 1,3	88,2 ± 3,1	91,2 ± 4,1
	2o	86,6 ± 5,5	85,o ± 3,4	9o,o ± 3,8
	4o	1o1,8 ± 4,2	56,8 ± 3,3	51,1 ± 1,o
Tolazamid	o,5	91,o ± 2,8	89,1 ± 2,4	98,1 ± 2,2
	1	92,6 ± 1,8	87,7 ± 2,7	94,8 ± 3,7
	2	93,1 ± 3,3	81,1 ± 2,7	87,2 ± 2,9
	4	94,6 ± 4,7	69,2 ± 1,3	73,7 ± 4,1

Gliclazid	o,2	94,o ± 3,9	92,3 ± 3,5	98,8 ± 5,9
	o,4	9o,5 ± 2,o	81,o ± 2,7	89,5 ± 2,1
	o,3	88,8 ± 4,5	72,8 ± 1,9	82,7 ± 4,9
	1,6	92,3 ± 2,6	53,6 ± 2,4	58,2 ± 2,8
Glisoxepid	o,o625	99,9 ± 3,9	77,1 ± 3,1	77,8 ± 5,5
	o,125	91,7 ± 1,7	73,2 ± 1,6	79,8 ± 1,o
	o,25	92,2 ± 1,4	58,2 ± 1,7	63,2 ± 1,8
	o,5	91,7 ± 1,4	42,2 ± 2,2	46,1 ± 2,7
Glidanil-Natrium	o,o625	89,5 ± 3,o	86,o ± 4,8	96,7 ± 7,6
	o,125	91,o ± 3,6	74,7 ± 3,3	82,8 ± 5,9
	o,25	93,7 ± 1,5	56,1 ± 2,6	59,9 ± 2,6
	o,5	9o,2 ± 3,9	5o,7 ± 2,9	56,2 ± 2,5
Glibenclamid	o,o5	93,4 ± 3,4	84,6 ± 3,2	9o,8 ± 3,6
	o,1	93,9 ± 2,8	7o,5 ± 4,2	75,4 ± 5,3
	o,2	94,8 ± 5,2	59,o ± 2,1	62,8 ± 4,4
	o,4	9o,5 ± 3,1	39,5 ± 2,o	43,7 ± 1,1
ZK 28 2o1	o,o625	9o,5 ± 1,2	97,6 ± 3,o	1o8,o ± 4,3
	o,125	92,5 ± 3,1	1oo,3 ± 2,5	1o8,9 ± 5,5
	o,25	9o,1 ± 2,o	81,3 ± 4,2	9o,6 ± 5,6
	o,5	91,7 ± 2,2	6o,2 ± o,5	65,2 ± 2,4
ZK 28 2oo	o,o1	9o,9 ± 3,2	85,1 ± 3,3	93,5 ± 3,7
	o,o2	89,5 ± 1,2	69,7 ± 2,4	78,o ± 3,1
	o,o4	91,3 ± 1,9	5o,4 ± 2,6	55,1 ± 2,2
	o,o8	9o,7 ± o,8	39,2 ± 1,9	43,3 ± 2,1

Forts. Tabelle 6

2. Versuchsreihe				
Kontrollen		77,3 ± 1,7	81,6 ± 3,o	1o5,6 ± 3,o
Tolbutamid	1o	78,o ± 2,6	7o,7 ± 1,7	91,1 ± 4,5
	2o	74,6 ± o,5	57,o ± o,9	76,4 ± 1,4
	4o	76,4 ± 4,2	43,4 ± 1,4	57,2 ± 3,4
	8o	73,7 ± 3,7	35,2 ± 2,6	48,3 ± 4,9
ZK 6o o49	4o	73,2 ± 2,4	67,1 ± 6,3	92,o ± 8,4
	8o	75,1 ± 1,7	69,5 ± 2,3	92,6 ± 3,1
	16o	76,5 ± 2,5	59,1 ± 1,3	77,4 ± 1,8
	32o	74,1 ± 2,5	46,6 ± 3,4	63,3 ± 5,9

Forts. Tabelle 6

Tabelle 7: Vergleich der relativen blutzuckersenkenden Wirksamkeit verschiedener β-cytotroper Substanzen nach i.v.-Injektionen bei gefütterten Ratten

Berechnungsgrundlage: Blutglucose in % des Ausgangswertes nach 1 Std

Rechenprogramm: Vergleich paralleler Dosiswirkungsgeraden (Dosen in logarithmischem, Wirkungen in linearem Maßstab)

Signifikante Wirksamkeitsunterschiede: ---: $p<0,05$, ——: $p<0,01$

Als Grundlage der Berechnung dienten die auf Tab. 6 dargestellten Versuche. Von den verschiedenen Substanzen wurden nur die Ergebnisse verwendet, die gegenüber den Kontrollen eine dosisabhängige Wirkung zeigten.

*Vergleich nicht möglich, da Wirkungsgeraden nicht parallel

Wirksamkeit der Testsubstanz gegenüber der Vergleichssubstanz (mit 95%-Vertrauensgrenze). Wirksamkeit der Vergleichssubstanz= 1,0

	Testsubstanz:	ZK 60 049	Glymidin-Na	Tolazamid	Gliclazid	Glisoxepid	Glidanil-Na	Glibenclamid	ZK 28 201	ZK 28 200
Vergleichs-substanz:	Tolbutamid	0,11 (0,08-0,15)	*	6,2 (4,7-8,0)	22,8 (17,9-30,0)	142,7 (119,8-174,3)	145,9 (107,7-198,0)	210,9 (167,1-272,1)	54,7 (41,1-71,9)	1348, (874,2-12
	Glymidin-Na	-	-	*	25,1 (20,0-31,3)	*	169,5 (104,2-250,0)	*	69,0 (52,6-86,2)	*
	Tolazamid	-	-	-	3,6 (2,6-5,9)	23,9 (18,8-32,7)	23,3 (15,6-34,8)	35,1 (26,0-49,8)	8,7 (5,9-13,0)	169,8 (134,1-22
	Gliclazid	-	-	-	-	6,0 (4,8-7,7)	6,5 (4,2-9,1)	8,8 (6,5-12,1)	2,6 (1,9-3,4)	44,8 (35,5-57,0
	Glisoxepid	-	-	-	-	-	1,03 (0,72-1,38)	1,41 (1,13-1,74)	0,40 (0,28-0,51)	7,4 (6,3-8,6)
	Glidanil-Na	-	-	-	-	-	-	1,45 (1,07-2,08)	0,37 (0,25-0,56)	7,2 (5,5-9,6)
	Glibenclamid	-	-	-	-	-	-	-	0,26 (0,17-0,36)	5,1 (4,2-6,3)
	ZK 28 201	-	-	-	-	-	-	-	-	19,0 (14,7-25,

Tabelle 8: Äquieffektive Dosen verschiedener ß-cytotroper Substanzen nach i.v.-Injektionen bei Ratten
(Aus den Dosiswirkungsgeraden errechnete Werte mit 95%-Vertrauensgrenzen)

*nicht auswertbar

Versuch	Substanz	Äquieffektive Dosen (mg/kg,i.v.)			
		Senkung der Blutglucose in 1 Std			
		auf 5o % des Vorwertes		auf 5o mg %	
II	ZK 60 049	593,1 (388,3 - 1o3.7)		265,8 (216,o - 368,o)	
I/II	Tolbutamid	58,9 (45,2 - 9o,3)	66,7 (52,5-94,o)	47,1 (37,4-68,1)	3o,9 (27,6-34
I	Glymidin-Na	4o,8 (33,6 - 51,o)		47,3 (39,8 - 65,3)	
I	Tolazamid	13,5 (6,2 - *)		12,3 (6,8 - *)	
I	Gliclazid	2,o2 (1,55 - 4,54)		1,83 (1,53 - 2,61)	
I	Glisoxepid	o,43 (o,38 - o,5o)		o,36 (o,32 - o,41)	
I	Glidanil-Na	o,38 (o,25 - 1,15)		o,35 (o,25 - o,7o)	
I	Glibenclamid	o,32 (o,26 - o,44)		o,27 (o,22 - o,33)	
I	ZK 28 201	o,76 (o,52 - 5,24)		o,73 (o,56 - 1,o8)	
I	ZK 28 200	o,o57 (o,o49 - o,o69)		o,o46 (o,o41 - o,o53)	

Tabelle 9: Hemmung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation durch orale Antidiabetica (Sulfonylharnstoffe und Biguanide) in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte pro Gruppe]

Testsubstanz	Konzentration (10^{-3} M)	Thrombocytenaggregation (% Kontrollwert)	Standardsubstanz	Konzentration (10^{-3} M)	Thrombocytenaggregation (% Kontrollwert)
ZK 60 049 (4)	1	107,1 ± 1,9	Tolbutamid (4)	1	103,9 ± 4,4
	2,5	94,3 ± 4,9		2,5	79,7 ± 2,5
	5	76,7 ± 1,4		5	61,7 ± 0,6
Glymidin-Natrium (6 - 7)	2	100,3 ± 4,7	Tolbutamid (2)	1	94,8 ± 5,2
	5	78,3 ± 3,9		2,5	59,7 ± 0,0
	10	48,5 ± 2,9		5	40,4 ± 1,6
Tolazamid (4)	1	97,5 ± 1,3	Tolbutamid (4)	1	99,5 ± 2,3
	2,5	71,5 ± 3,1		2,5	73,9 ± 0,8
	5	35,3 ± 1,4		5	46,8 ± 1,4
Gliclazid (4)	1	78,2 ± 2,5	Tolbutamid (4)	1	95,3 ± 2,6
	2,5	56,0 ± 4,3		2,5	71,2 ± 2,5
	5	36,8 ± 3,8		5	54,1 ± 1,8
Glisoxepid 1.Versuch (4)	1	91,7 ± 1,9	Tolbutamid 1.Versuch (4)	1	112,2 ± 3,5
	2,5	67,0 ± 2,1		2,5	66,1 ± 5,2
	5	45,4 ± 2,1		5	34,5 ± 4,6
2.Versuch (5)	1	95,7 ± 2,3	2.Versuch (5)	1	97,3 ± 1,7
	2,5	82,6 ± 7,1		2,5	77,6 ± 2,6
	5	59,7 ± 17,5		5	48,2 ± 3,2
Glidanil-Natrium (4)			Tolbutamid (4)	1	103,6 ± 3,1
	2,5	79,7 ± 2,8		2,5	74,1 ± 6,6
	5	18,1 ± 2,4		5	59,5 ± 4,1
Glibenclamid (4)	0,2	107,0 ± 5,1	Tolbutamid (4)	1	103,8 ± 2,1
	0,5	84,8 ± 2,3		2,5	62,9 ± 1,6
	1,0	64,6 ± 2,6		5	30,0 ± 2,8

ZK 28 201	1	94,o ± 2,2	Tolbutamid	1	92,5 ± 4,6
1.Versuch	2,5	67,9 ± 2,5	1.Versuch	2,5	7o,4 ± 2.2
(4)			(4)	5	51,2 ± 1,1
2.Versuch	1	1oo,8 ± 9,1	2.Versuch	1	93,9 ± 4,6
(3-4)	2,5	79,5 ± 3,5	(4)	2,5	73,1 ± 5,o
	5	36,1 ± 3,7		5	51,5 ± 1,5
ZK 28 200	1	65,4 ± 2,7	Tolbutamid	1	92,5 ± 4,6
1.Versuch	2,5	49,o ± 1,4	1.Versuch	2,5	7o,4 ± 2,2
(4)			(4)	5	51,2 ± 1,1
2.Versuch	o,2	93,2 ± 1,3	2.Versuch	1	96,7 ± 2,5
	o,5	81,5 ± 1,3			
	1,o	52,3 ± 1,4		2,5	73,5 ± 2,3
(4-8)	2,5	31,6 ± 1,4	(8)		
	5,o	16,3 ± o,8		5	49,1 ± 1,3
1-Butyl-biguanid-Hydrochlorid (4)	1	83,8 ± o,4	Tolbutamid (4)	1	1o3,8 ± 2,1
	2,5	76,8 ± 3,3		2,5	62,9 ± 1,6
	5	69,2 ± 3,8		5	3o,o ± 2,8
Phenformin-Hydrochlorid (4)	1	78,2 ± 3,4	Tolbutamid (4)	1	1o3,6 ± 3,1
	2,5	68,8 ± 2,7		2,5	74,1 ± 6,6
	5	52,7 ± 2,o		5	59,5 ± 4,1

Tabelle 1o: Einfluß niedriger Konzentrationen von Tolbutamid und Glisoxepid auf die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation
[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ( ) = Werte/Gruppe]

Substanz (Konz.)		Thrombocytenaggregation (% Kontrollwert)
Tolbutamid (6)	[$5 \cdot 10^{-4}$ M]	113,2 ± 3,2
	[$2,5 \cdot 10^{-4}$ M]	11o,7 ± 3,1
	[$1 \cdot 10^{-4}$ M]	1o6,8 ± 1,7
	[$5 \cdot 10^{-5}$ M]	1o2,6 ± 2,2
	[$2,5 \cdot 10^{-5}$ M]	1o7,o ± 4,7
	[$1 \cdot 10^{-5}$ M]	1o1,8 ± 5,8
Glisoxepid (2)	[$5 \cdot 10^{-4}$]	86,4 ± 9,5
	[$2,5 \cdot 10^{-4}$]	96,1 ± 5,3
	[$1 \cdot 10^{-4}$]	97,4 ± 4,2
	[$5 \cdot 10^{-5}$]	1o6,4 ± 3,2
	[$2,5 \cdot 10^{-5}$]	117,8 ± 1,5
	[$1 \cdot 10^{-5}$]	99,5 ± 9,3

Zwischen den verschiedenen Sulfonamidderivaten bestanden zwar Unterschiede in der relativen aggregationshemmenden Wirksamkeit, sie waren jedoch erheblich geringer als die entsprechenden Differenzen in Bezug auf ihren blutglucosesenkenden Effekt (Tabelle 11). So war mit ZK 28 2oo nur in etwa 2,5fach niedrigeren Konzentrationen der gleiche Effekt zu erzielen wie mit Tolbutamid, während sich die äquieffektiven blutglucosesenkenden Dosen beider Substanzen etwa um drei Zehnerpotenzen unterschieden. Entsprechendes gilt für die übrigen neueren Antidiabetica, die im Vergleich zu Tolbutamid und Glymidin-Natrium in mindestens 2ofach geringerer Dosierung eine gleiche Blutzuckersenkung hervorriefen (Glisoxepid, Glidanil-Natrium, Glibenclamid und Gliclazid). Ihr aggregationshemmender Effekt war entweder bei der gleichen oder nur bis zu 50 % niedrigeren Konzentration genauso stark ausgeprägt wie die Wirkung von Tolbutamid (Tabelle 11, Tabelle 13).

Trotz dieser Differenzen in der Größenordnung der Wirksamkeitsunterschiede an ß-Zellen (in vivo) und Thrombocyten (in vitro) war jedoch eine Einheitlichkeit in der Grundtendenz an beiden Zellsystemen erkennbar. Mit Ausnahme von Glymidin-Natrium hemmten zumindest Substanzen mit stärkerer blutzuckersenkender Wirksamkeit die ADP-abhängige Thrombocytenaggregation nicht schlechter als Tolbutamid,und die schwächer hypoglykämisch wirkende Verbindung ZK 6o 049 setzte die Aggregation der Blutplättchen in gleicher Konzentration auch weniger herab als die Standardsubstanz. In beiden Testanordnungen erwiesen sich ZK 28 2oo und Glibenclamid als die jeweils wirksamsten bzw. zweitwirksamsten Substanzen. Der deutliche Unterschied zwischen den beiden optisch aktiven Isomeren ZK 28 2o1 und ZK 28 2oo, der sich in Bezug auf ihren blutglucosesenkenden Effekt ergeben hatte, war auf einem niedrigeren Niveau auch an den Thrombocyten erkennbar. Auch hier zeigte die linksdrehende Verbindung (ZK 28 2oo) eine höhere relative Wirksamkeit als der rechtsdrehende Antipode (Tabelle 12, Tabelle 13).
Man kann daher annehmen, daß zwischen den Sulfonylharnstoffrezeptoren an den ß-Zellen und Thrombocyten zwar Unterschiede in der Affinität zu den einzelnen Substanzen bestehen, daß es sich jedoch nicht um grundsätzlich verschiedene Strukturen handeln dürfte.

3.2. Beziehungen zwischen Prostaglandinsynthese und Hemmung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation durch Sulfonylharnstoffe

Zur Frage nach der Ursache des aggregationshemmenden Effektes ß-cytotroper Sulfonylharnstoffe wurde geprüft, ob sich Anhaltspunkte für Beziehungen zwischen diesen Substanzen und dem Stoffwechsel oder der Wirkung von Prostaglandinen finden lassen.

3.2.1. Einfluß von PGE_1, PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ auf die Thrombocytenaggregation

Ein Zusatz von Prostaglandin E_1 zum Inkubationsansatz führte zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Thrombocytenaggregation. Die minimale Hemmkonzentration lag bei 1 - 2 ng/ml, eine vollständige Hemmung wurde mit loo ng PGE_1/ml erzielt (Tabelle 14).

Tabelle 11: Vergleiche der relativen Wirksamkeiten verschiedener oraler Antidiabetica (Sulfonylharnstoffe und Biguanide) in Bezug auf ihre Hemmung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation in vitro

Berechnungsgrundlage: Thrombocytenaggregation in % des Kontrollwertes

Rechenprogramm: Vergleich paralleler Dosiswirkungsgeraden (Dosen in logarithmischem, Wirkung in linearem Maßstab)

*Vergleich nicht möglich, da Wirkungsgeraden nicht parallel

** $> 10^{-3}$

Signifikanter Wirksamkeitsunterschied: —— : $p < 0{,}01$;

	Relative Wirksamkeit der Testsubstanz gegenüber dem Standard (Tolbutamid:Wirksamkeit =1,0)mit Angabe der 95%-Vertrauensgrenzen	Äquieffektive Dosen (10^{-3} M) mit 95 %-Vertrauensgrenzen	
		Erniedrigung der Thrombocytenaggregation auf 50% des Kontrollwertes	
		Testsubstanz	Standard (Tolbutamid
ZK 60 049	0,59 (0,47 - 0,73)	14,3 (7,8 - **)	7,5 (6,0 -10,4)
Glymidin-Na	0,36 (0,27 - 0,47)	10,3 (8,5 - 13,6)	3,6 (3,1 - 4,4)
Tolazamid	*	3,8 (3,5 - 4,1)	4,8 (4,3 - 5,4)
Gliclazid	1,91 (1,57 - 2,37)	3,0 (2,6 - 3,8)	5,8 (4,9 - 7,2)
Glisoxepid (1.Versuch)	*	4,4 (3,9 - 5,0)	3,6 (3,2 - 4,2)
(2.Versuch)	0,83 (0,61 - 1,09)	8,8 (5,5 - 27,4)	5,2 (4,4 - 6,6)
Glidanil-Na	*	3,7 (3,5 - 3,9)	5,6 (4,6 - 7,8)
Glibenclamid	*	1,78 (1,31 - 2,93)	3,3 (3,1 - 3,5)

Forts. Tabelle 11:

ZK 28 201 (1.Versuch)	1,o2 (o,82 - 1,24)	4,7 (3,5 - 7,9)	5,4 (4,4 - 7,1)
(2.Versuch)	o,99 (o,71 - 1,37)	4,2 (3,1 - 7,2)	5,5 (4,3 - 8,3)
ZK 28 200 (1.Versuch)	2,67 (2,11 - 3,54	2,4 (1,88 - 3,7)	5,4 (4,4 - 7,1)
(2.Versuch)	*	1,11 (1,oo -1,21)	5,1 (4,5 - 5,9)
1-Butylbiguanid Hydrochlorid	*	44,4 (14,o - **)	3,3 (3,1 - 3,5)
Phenformin-Hydrochlorid	1,48 (o,53 - 2,69)	5,4 (4,6 - 6,8)	5,6 (4,6 - 7,8)

Tabelle 12: Vergleich der aggregationshemmenden Wirkung von ZK 28 2oo und ZK 28 2o1

* Berechnung nicht möglich, da Dosiswirkungskurven nicht linear oder parallel. ** $> Io^{-3}$

Versuch	Konzentration (Io^{-3}M)	Thrombocytenaggregation (% Kontrollen) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Konzentration (Io^{-3}M)	Thrombocytenaggregation (% Kontrollen) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
1	o,2	93,o ± 3,6		
(n=3)	1,o	5o,4 ± 4,7	1,o	79,9 ± 2,1
	2,5	4o,9 ± o,8	2,5	68,1 ± 3,4
2				
(n=4)	1,o	65,4 ± 2,7	1,o	94,o ± 2,2
	2,5	49,o ± 1,4	2,5	67,9 ± 2,5
3	o,2	93,2 ± 1,3	1,o	1oo,8 ± 9,1
(n=4-5)	o,5	81,5 ± 1,3	2,5	79,5 ± 3,5
	1,o	54,9 ± 1,o	5,o	36,1 ± 3,7

Versuch	Relative Wirksamkeit von ZK 28 2oo gegenüber ZK 28 2o1 (Wirksamkeit =1) mit Angabe der 95 %-Vertrauensgrenzen	Äquieffektive Dosen (Io^{-3}M) mit 95 %-Vertrauensgrenzen	
		Senkung der Thrombocytenaggregation auf 5o % des Kontrollwertes	
		ZK 28 2oo	ZK 28 2o1
1	3,55 (2,36 - 5,71)	1,36 (1,o2 - 1,95)	1o,1 (3,7 - **)
2	2,79 (2,o6 - 4,38)	2,4 (1,9 - 3,7)	4,7 (3,5 - 7,9)
3	*	*	4,2 (3,1 - 7,2)

Tabelle 13: Vergleich der äquieffektiven Dosen verschiedener ß-cytotroper Substanzen in Bezug auf ihren blutglucosesenkenden Effekt in vivo und ihre aggregationshemmende Wirkung in vitro

Die angegebenen Relativwerte wurden aus den in Tabelle 8 und 11 dargestellten Mittelwerten errechnet. Die Tolbutamiddosen wurden hierbei =loo gesetzt.

	Blutglucosesenkung auf 5o % des Ausgangswertes	Hemmung der Thrombocytenaggregation auf 5o % des Kontrollwertes
Tolbutamid (Standard)	loo	loo
ZK 6o o49	889	191
Glymidin-Natrium	69	286
Tolazamid	23	79
Gliclazid	3,4	52
ZK 28 2o1	1,29	87
Glisoxepid	o,73	122
Glidanil-Natrium	o,65	66
Glibenclamid	o,54	54
ZK 28 2oo	o,1o	44

Tabelle 14: Einfluß von PGE_1 auf die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation in vitro

$[\bar{x} \pm s_{\bar{x}}]$

PGE_1-Konzentration (ng/ml)	n	Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes)
1	5	92,o ± 2,3
2	28	84,3 ± 1,3
3,3	6	75,8 ± 5,9
4	27	65,1 ± 2,o
5	1o	54,7 ± 2,o
6,6	6	5o,4 ± 4,o
1o	13	34,9 ± 2,2
5o	5	11,o ± 1,1
1oo	5	o ± o
1ooo	16	o ± o

Im Gegensatz dazu steigerte Prostaglandin E_2 in diesem Konzentrationsbereich die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation. Oberhalb von 2oo ng PGE_2/ml nahm der Effekt wieder ab und ging in eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregation über, die bei 4o µg/ml nahezu vollständig war (Tabelle 15). Die steigernde Wirkung von 1 µg/ml PGE_2 wurde durch Zusatz der gleichen Menge an PGE_1 vollständig aufgehoben (Tabelle 16).

Mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ konnte ebenfalls die Thrombocytenaggregation gesteigert werden. Allerdings waren im Vergleich zu PGE_2 die hierfür erforderlichen Dosen erheblich höher; sie lagen zwischen o,4 und 1o µg/ml Ansatz (Tabelle 17). Aus dem Abstand der beiden Dosiswirkungskurven wurde eine annähernd 25ofach geringere Wirksamkeit von $PGF_{2\alpha}$ gegenüber PGE_2 errechnet (Tabelle 18). Ob $PGF_{2\alpha}$ bei einer weiteren Konzentrationssteigerung wie PGE_2 zu einer Hemmung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation führt, wurde nicht untersucht.

3.2.2. Einfluß von Hemmstoffen der Prostaglandinsynthese (nichtsteroidale Entzündungshemmstoffe) auf die Thrombocytenaggregation

Da Prostaglandine die Thrombocytenaggregation beeinflussen und außerdem in Thrombocyten nachgewiesen wurden (SMITH, INGERMAN, KOCSIS and SILVER, 1973), lag die Frage nahe, ob Hemmstoffe der Prostaglandinsynthese den Aggregationsvorgang ebenfalls modifizieren. Durch Arbeiten einer Reihe von Autoren, vor allem der Arbeitsgruppe von VANE, ist bekannt, daß nichtsteroidale Antiphlogistica wie Acetylsalicylsäure und Indomethacin sowohl in vitro an Prostaglandinsynthetase enthaltenden Enzympräparationen als auch in allen bisher untersuchten Geweben in vivo die Prostaglandinsynthese hemmen (VANE, 1972a, 1972b, 1973; WILLIS, DAVISON, RAMWELL, BROCKLEHURST and SMITH, 1972; s. dort jeweils weitere Literatur).

Wie die auf der Tabelle 19 dargestellten Ergebnisse zeigen, hemmen beide Verbindungen die Thrombocytenaggregation in Konzentrationen zwischen $1o^{-3}$M und $5 \cdot 1o^{-3}$M. Indomethacin zeigte hierbei eine höhere relative Wirksamkeit als Acetylsalicylsäure; die zur Erzielung einer 5o%igen Hemmung erforderlichen Dosen unterschieden sich etwa um den Faktor 5.

Unter Berücksichtigung der entgegengesetzten Wirkung von PGE_1 und PGE_2 ($PGF_{2\alpha}$) wurde dieses Ergebnis als Hinweis auf eine Einschränkung der Synthese aggregationsfördernder Prostaglandine, also vor allem des in niedrigen Konzentrationen wirksamen PGE_2, durch die beiden Entzündungshemmstoffe angesehen.

Tabelle 15: Einfluß von PGE_2 auf die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation in vitro

$[\bar{x} \pm s_{\bar{x}}]$

1. Versuch

PGE_2-Konzentration (ng/ml)	n	Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes)
2	3	1o6,2 ± 14,3
1o	3	191,8 ± 3,6
2o	3	233,1 ± 26,1
4o	3	274,4 ± 13,3
1oo	3	277,2 ± 32,2
2oo	3	281,4 ± 13,7
5oo	3	267,2 ± 9,2
1ooo	6	19o,8 ± 8,1

2. Versuch

PGE_2-Konzentration (µg/ml)	n	Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes)
o,2	4	174,9 ± 7,2
1	4	13o,1 ± 9,6
1,25	4	122,8 ± 7,5
2,5	4	1o8,6 ± 5,1
5	5	61,8 ± 5,3
1o	4	2o,9 ± 3,5
4o	2	7,8 ± 2,7

Tabelle 16: Einfluß von PGE_1 + PGE_2 auf die ADP-abhängige Thrombocytenaggregation

$[\ \bar{x} \pm s_{\bar{x}}\ ]$

PG-Konzentration	n	Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes)
PGE_1 (1 µg/ml)	7	o ± o
PGE_2 (1 µg/ml)	7	175,6 ± 3,7
PGE_1 (1 µg/ml) + PGE_2 (1 µg/ml)	5	o ± o

Tabelle 17: Einfluß von $PGF_{2\alpha}$ auf die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation in vitro
$[\bar{x} \pm s_{\bar{x}}]$

$PGF_{2\alpha}$-Konzentration (µg/ml)	n	Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes)
0,4	4	120,3 ± 10,0
1	10	142,0 ± 6,4
2	4	173,2 ± 13,5
10	4	216,2 ± 13,2

Tabelle 18: Vergleich der aggregationsfördernden Wirksamkeit von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ in vitro

Berechnungsgrundlage: ADP-abhängige Thrombocytenaggregation, % des Kontrollwertes

Verwendung der auf Tabelle 15 (oberer Teil) und Tabelle 17 angegebenen, in einem Ansatz ermittelten Ergebnisse

Rechenprogramm: Vergleich paralleler Dosiswirkungsgeraden (Dosen in logarithmischem, Wirkungen in linearem Maßstab).

Relative Wirksamkeit von PGE_2 im Vergleich zu $PGF_{2\alpha}$ (=1,0) mit 95 %-Vertrauensgrenzen
244 (133 - 526)

Der Unterschied ist signifikant ($p<0,01$)

Tabelle 19: Hemmung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation durch nichtsteroidale Entzündungshemmstoffe

(Die berechneten Dosiswirkungsgeraden waren nicht parallel, deshalb war ein Vergleich der relativen Wirksamkeiten nicht möglich.)

		Thrombocyten-aggregation	Äquieffektive Dosen [10^{-3} M]
Substanz (n)	Konzentration (10^{-3} M)	% des Kontrollwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)	50 %ige Hemmung der Aggregation (Dosis mit 95 %-Vertrauensgrenzen)
Indomethacin (4-6)	0,83	119,9 ± 7,8	1,45 (1,38 - 1,54)
	1,25	71,3 ± 4,2	
	1,88	15,2 ± 10,5	
Acetylsalicylsäure (4-6)	1	99,7 ± 4,6	7,73 (5,89 - 11,84)
	2,5	81,1 ± 2,0	
	5	58,7 ± 2,1	

3.2.3. Einfluß von Sulfonylharnstoffen und nichtsteroidalen Entzündungshemmstoffen auf die PGE_2-Konzentration in thrombocytenreichem Plasma

Die aus den Ergebnissen der Aggregationsmessung mit nichtsteroidalen Entzündungshemmstoffen gezogenen Schlüsse wurden im Prinzip durch die Resultate der Prostaglandinbestimmung bestätigt (Tabelle 2o). Unter den gleichen experimentellen Bedingungen, unter denen Acetylsalicylsäure die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation hemmte, nahm die PGE_2-Konzentration im Inkubationsansatz gegenüber den Kontrollen ab. Auch unter dem Einfluß von Indomethacin wurde bei einem parallel durchgeführten Versuch in drei von vier Versuchsproben ein geringerer PGE_2-Gehalt gemessen als in den fünf Kontrollansätzen. Für eine statistische Sicherung mit einem Irrtumsrisiko von weniger als 5 % reichte dieses Ergebnis aber nicht aus.

Im Gegensatz dazu wurde weder durch Glisoxepid noch (bei zwei Experimenten) durch Glibenclamid in sicher aggregationshemmenden Konzentrationen der PGE_2-Gehalt unter den Kontrollwert erniedrigt. Dieser Befund spricht dagegen, daß die pharmakologische Wirkung der Sulfonylharnstoffe an den Thrombocyten auf einer Hemmung der Prostaglandin-(E_2)-Synthese und -Abgabe beruht.

3.2.4. Einfluß einer Kombination von Sulfonylharnstoffen und Hemmstoffen der Prostaglandinsynthese auf die Thrombocytenaggregation

Abschließend wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob Sulfonylharnstoffe und Acetylsalicylsäure ihre aggregationshemmenden Effekte gegenseitig verstärken oder ob nur eine Addition der Wirkungen festzustellen ist. Bei einer Abschwächung der aggregationsfördernden Wirkung endogener Prostaglandine durch Sulfonylharnstoffe wäre z.B. zu erwarten, daß die Hemmwirkung eines Inhibitors der Prostaglandinsynthese durch gleichzeitigen Zusatz eines ß-cytotropen Antidiabeticums überadditiv verstärkt wird.

Die Ergebnisse derartiger Kombinationsversuche sind auf der Tabelle 21 angegeben. Sie wurden mit Acetylsalicylsäure und Glisoxepid bzw. Glibenclamid durchgeführt. In beiden Fällen war keine Potenzierung der Hemmeffekte festzustellen, da die jeweilige Verminderung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation nicht den Wert unterschritt, der bei einer Verdoppelung der Konzentration des Antiphlogisticums oder der Antidiabetica erzielt wurde. Zusammen mit den Ergebnissen der Prostaglandinbestimmungen sprechen diese Resultate dagegen, daß die aggregationshemmende Wirkung der Sulfonylharnstoffderivate durch einen Eingriff in das Prostaglandinsystem der Thrombocyten zustande kommt.

Tabelle 2o: Einfluß von oralen Antidiabetica und nichtsteroidalen Entzündungshemmstoffen auf die PGE_2-Konzentration in TRP

(unter den Bedingungen der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation)
[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Statistik: U-Test; signifikante Abnahme gegenüber den Kontrollen: +:$p<o,o5$, -:$p>o,o5$]

Substanz ($1o^{-3}M$)	Konz. [$1o^{-3}M$]	n	PGE_2-Konzentration (ng/ml TRP)
Kontrollen		5	1,54 ± o,28
Glisoxepid	5,o	5	1,51 ± o,24 (-)
Glibenblamid	1,o	4	1,52 ± o,19 (-)
Indomethacin	2,5	4	o,87 ± o,35 (-)
Kontrollen		4	1,23 ± o,15
Glibenclamid	1	3	1,36 ± o,o9 (-)
Acetylsalcylsäure	2,5	3	o,53 ± o,o7 (+)

Tabelle 21: Einfluß einer Kombination von ß-cytotropen Substanzen und Acetylsalicylsäure auf die ADP-abhängige Thrombocytenaggregation

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Statistik: U-Test: -:p>o,o5, +: p<o,o5]

Substanz	Konzentration [10^{-3} M]	n	Thrombocytenaggregation (% Kontrollwert)	Signifikante Abnahme gegenüber:
Glisoxepid	1,25	3	92,6 ± 1,6	
	2,5	3	78,6 ± 4,5	Glis. (1,25): +
Acetylsalicylsäure	1,25	3	75,5 ± o,3	
	2,5	3	47,o ± 1,6	Acet. (1,25): +
Glisoxepid + Acetylsalicylsäure	1,25 1,25	3	69,7 ± 4,5	Glis. (1,25): + Glis. (2,5): - Acet. (1,25): - Acet. (2,5): -
Glibenclamid	o,5	3	83,o ± 3,2	
	1,o	3	66,5 ± 1,8	Glib. (o,5): +
Acetylsalicylsäure	1,o	4	77,8 ± 4,1	
	2,o	4	52,9 ± 2,4	Acet. (1,o): +
Glibenclamid + Acetylsalicylsäure	o,5 1,o	3	63,5 ± 2,3	Glib. (o,5): + Glib. (1,o): - Acet. (1,o): + Acet. (2,o): -

3.3. Beziehungen zwischen dem cAMP-System und der durch Sulfonylharnstoffe verursachten Hemmung der Thrombocytenaggregation

3.3.1. Beeinflussung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation durch cAMP und Substanzen mit nachgewiesener Wirkung auf das cAMP-System

Der hemmende Effekt von PGE_1 wird auf eine Stimulation der Adenylatcyclase der Thrombocyten und damit eine Steigerung der cAMP-Konzentration zurückgeführt; die Aufhebung der PGE_1-Wirkung durch PGE_2 geht mit einer Senkung der erhöhten cAMP-Konzentration einher (SHIO, RAMWELL und JESSUP, 1972). Von diesen Befunden ausgehend wurde zur näheren Charakterisierung des cAMP-Systems der Thrombocyten zunächst untersucht, ob cAMP bzw. sein Dibutyrylderivat selbst und Substanzen, die an anderen Geweben als Stimulatoren der cAMP-Synthese oder Hemmstoffe des cAMP-Abbaus bekannt sind, die Thrombocytenaggregation hemmen oder Verbindungen, von denen aus anderen Geweben gegenteilige Wirkungen bekannt sind, die Thrombocytenaggregation fördern.

3.3.1.1. Dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphat (DBcAMP)

Da cAMP selbst wegen seines polaren Charakters Zellmembranen nur schwer durchdringt (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971), wurde DBcAMP untersucht. Wie aus der Tabelle 22 hervorgeht, hemmt diese Substanz dosisabhängig die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation.

3.3.1.2. Substanzen mit steigernde Wirkung auf die cAMP-Konzentration (durch Stimulation der Adenylatcyclase oder Hemmung der Phosphodiesterase)

Theophyllin, ein Hemmstoff des cAMP-abbauenden Enzyms (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971), führt wie DBcAMP bei Zusatz von Konzentrationen zwischen o,25 und 1,o . 10^{-3} M zu einer dosisabhängigen Einschränkung der Thrombozytenaggregation (Tabelle 23). Die zu einer 5o %igen Hemmung erforderliche Konzentration liegt bei etwa 1,2 . 10^{-3} M und damit in der gleichen Größenordnung wie der für Glibenclamid und Indomethacin ermittelte Wert.

Catecholamine stimulieren über ihre ß-adrenerge Wirkkomponente die Adenylatcylase und erhöhen damit die intracelluläre cAMP-Konzentration, während eine Stimulation α-adrenerger Rezeptoren zu einer Senkung des cAMP-Gehalts führt. Wie an anderen Geweben wurde dieser Zusammenhang auch an Thrombocyten (Humanblutplättchen) nachgewiesen (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971, ROBISON, ARNOLD und HARTMANN, 1969). Hiermit stimmt überein, daß Isopropylnoradrenalin (Isoprenalin) die Thrombocytenaggregation hemmte (Tabelle 24). Auch Adrenalin hatte bei den vorliegenden Versuchen an Rattenthrombocyten eine gleichartige Wirkung. Dies ist insofern eine Besonderheit, als Adrenalin sowohl mit ß- als auch α-Rezeptoren reagiert und nach den bisher mitgeteilten Ergebnissen an Humanthrombocyten die α-adrenerge Wirkung und damit eine Steigerung bzw. sogar Auslösung der Thrombocytenaggregation im Vordergrund steht (SALZMAN und LEVINE, 1971, SALZMAN, 1972; HASLAM, 1971).

Tabelle 22: Einfluß von Dibutyryl-cAMP auf die ADP-abhängige Thrombocytenaggregation in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n = 4 Werte /Gruppe; Statistik: U-Test; +:p<o,o5]

Dibutyryl-cAMP	Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes)	Signifikante Abnahme gegenüber
o,5 . $1o^{-3}$M	65,3 ± 1,3	
1 . $1o^{-3}$M	37,5 ± 1,2	o,5 · $1o^{-3}$M: +

Tabelle 23: Einfluß von Theophyllin auf die ADP-abhängige Thrombocytenaggregation in vitro

[n= 4 Werte/Gruppe; Berechnung der Dosiswirkungsgeraden]

Theophyllin [. $1o^{-3}$M]	Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	50 % Hemmung der Aggregation Dosis mit Angabe der 95 %-Vertrauensgrenze [. $1o^{-3}$M]
o,25	85,3 ± 2,8	
o,5	73,4 ± 1,5	1,17
1,o	52,3 ± 2,4	(o,97 - 1,55)

Tabelle 24: Einfluß von Adrenalin, Isopropylnoradrenalin, Glucagon und Insulin auf die ADP-abhängige Thrombocytenaggregation in vitro [$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe]

Substanz	Konzentration	Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes)
Adrenalin	0,2 µg/ml	101,7 (1)
	0,5 µg/ml	93,4 ± 9,1 (4)
	1 µg/ml	87,9 ± 6,6 (4)
	10 µg/ml	89,9 (1)
	50 µg/ml	52,4 ± 5,1 (5)
	100 µg/ml	24,4 ± 4,4 (2)
Isopropylnor-adrenalin	0,062 µg/ml ($2{,}5.10^{-7}$M)	42,0 ± 1,5 (7)
	0,62 µg/ml ($2{,}5.10^{-6}$M)	36,4 ± 3,4 (7)
	6,2 µg/ml ($2{,}5.10^{-5}$M)	17,2 ± 1,1 (6)
	62 µg/ml ($2{,}5.10^{-4}$M)	17,6 ± 0,8 (6)
Glucagon (4)	0,25 µg/ml	100,1 ± 2,5
	0,5 µg/ml	103,4 ± 2,6
	1 µg/ml	102,2 ± 5,6
Insulin (5)	250 µE/ml	103,7 ± 6,9
	500 µE/ml	102,5 ± 5,2
	1000 µE/ml	107,1 ± 5,0

Daß jedoch grundsätzlich auch an Rattenthrombocyten beide Arten von adrenergen Rezeptoren und die durch sie gesteuerten Regelmechanismen vorhanden sind, geht aus Versuchen mit α- und ß-Rezeptoren blockierenden Substanzen hervor. Der α-Rezeptorenblocker Phentolamin führte in einer Konzentration (10^{-4} M), in der nur eine geringe Eigenwirkung der Substanz erkennbar war, infolge einer Ausschaltung der α-adrenergen aggregationsfördernden Wirkkomponente des Adrenalins zu einer erheblichen Verstärkung der Hemmwirkung dieses Catecholamins (Tabelle 25). Bei einer Dosissteigerung war außerdem ein aggregationshemmender Eigeneffekt von Phentolamin erkennbar. Da Thrombocyten u.a. granulär gespeicherte Catecholamine enthalten (BORN, 1968), die im Zusammenhang mit dem Aggregationsvorgang freigesetzt werden (SALZMAN, 1972), ist dieser Befund durch eine Verhinderung des α-Rezeptoren stimulierenden Effekts von endogenem Adrenalin oder Noradrenalin erklärbar.

Durch Zusatz eines ß-Rezeptorenblockers (Methylphenoxyisopropylaminopropanol, Kö 592) wurde in umgekehrter Weise die aggregationshemmende Wirkung von Adrenalin abgeschwächt und - infolge der Ausschaltung der ß-adrenergen Komponente - in eine Steigerung der Thrombocytenaggregation umgekehrt. In höheren Konzentrationen führte Kö 592 selbst zu einer Verminderung der Thrombocytenaggregation. Da die meisten ß-Rezeptorenblocker neben ihren ß-antagonistischen auch schwache ß-agonistische Eigenschaften besitzen, ist dieser Effekt nicht verwunderlich (Tabelle 26).

Im Gegensatz zu den Catecholaminen beeinflußt Glucagon, das an Leber-, Insel- und Fettzellen die Adenylatcyclase stimuliert, an Thrombocyten offensichtlich nicht das cAMP-System. In Konzentrationen bis zu 1 µg/ml war keine oder nur eine geringfügige Hemmung der Thrombocytenaggregation zu erkennen (Tabelle 24). Hiermit stimmt eine Beobachtung von ZIEVE und GREENOUGH III (1969) überein, die erst mit 4o mg Glucagon/ml Ansatz eine Stimulation der Adenylatcyclase an membranhaltigen Thrombocytenlysaten beobachteten.

Die bereits aus anderen Untersuchungen bekannte Aggregationsverminderung durch Adenosin und Adenosinanaloga (CAEN, JENKINS, MICHEL und BELLANGER, 1972; BORN, 1962; KIKUGAWA, IIZUKA, HIGUCHI, HIRAYAMA und ICHINO, 1972) konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Sowohl Adenosin als auch zwei an N^6 substituierte Derivate hatten eine dosisabhängige Hemmung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation zur Folge (Tabelle 27). Da dieser Effekt durch Zusatz des Phosphodiesterasehemmstoffes Theophyllin potenziert, d.h. überadditiv verstärkt wurde, ist es wahrscheinlich, daß die untersuchten Substanzen die cAMP-Synthese stimulieren (Tabelle 28). Als Beweis für eine Potenzierung wurde eine stärkere Abnahme der Aggregation gewertet, als bei einer Verdoppelung der eingesetzten Theophyllin- oder Adenosin(derivat)konzentrationen erzielt werden konnte.

Durch eine auf die gleiche Weise nachgewiesene Potenzierung der aggregationshemmenden Wirkung von PGE_1 durch Theophyllin konnte auch für diese Verbindung gezeigt werden, daß ihr Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Stimulation der thrombocytären Adenylatcyclase zurückzuführen ist (Tabelle 29).

Tabelle 25: Einfluß von Phentolamin sowie Adrenalin + Phentolamin auf die Thrombocytenaggregation in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Statistik: U-Test; -:p>o,o5, +:p<o,o5; ()=Werte/Gruppe]

Substanz	Konzentration	Thrombocyten-aggregation (% des Kontroll-wertes)		Signifikante Abnahme gegenüber
Phentol-amin	o,1 . 10^{-3}M	8o,4 ± 2,8	(4)	
	o,2 . 10^{-3}M	57,7 ± o,8	(4)	o,1 . 10^{-3}M:+
	o,25 . 10^{-3}M	48,1 ± 4,2	(2)	
	o,5 . 10^{-3}M	6,3	(1)	
	1,o . 10^{-3}M	4,4 ± o,6	(3)	o,1 . 10^{-3}M:+ o,2 . 10^{-3}M:+
Adrenalin	o,5 µg/ml	85,5 ± 6,4	(3)	
	1,o µg/ml	82,2 ± 4,8	(3)	Adr. (o,5 µg/ml): -
Phentol-amin	o,1 . 10^{-3}M	77,8 ± 2,2	(3)	
	o,2 . 10^{-3}M	61,9 ± 1,6	(3)	Phent.(o,1 . 10^{-3}M): +
Adrenalin + Pehntol-amin	o,5 µg/ml o,1 . 10^{-3}M	42,7 ± 1,1	(3)	Adr. (o,5 µg/ml): + Adr. (1,o µg/ml): + Phent.(o,1 . 10^{-3}M): + Phent.(o,2 . 10^{-3}M): +

Tabelle 26: Einfluß von Kö 592 (Methylphenoxyisopropylaminopropanol) sowie Adrenalin und Kö 592 auf die Thrombocytenaggregation in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Statistik: U-Test; -:p>o,o5, +:p<o,o5, n=3 (4)= Werte/Gruppe]

Substanz	Konzentration	Thrombocyten-aggregation (% des Kontrollwertes)	Signifikante Abnahme gegenüber
Kö 592	o,1 - $1o^{-3}$M	95,6 ± 2,3	
	o,5 . $1o^{-3}$M	85,o ± 1,3 (4)	Kö (o,1 - $1o^{-3}$M): +
	1 . $1o^{-3}$M	66,3 ± 2,3 (4)	Kö (o,1 . $1o^{-3}$M): +
			Kö (o,5 . $1o^{-3}$M): +
Adrenalin	o,5 µg/ml	85,5 ± 6,4	
	1 µg/ml	82,2 ± 4,8	Adr.(o,5 µg/ml): -

Substanz	Konzentration	Thrombocyten-aggregation (% des Kontrollwertes)	Signifikante Steigerung gegenüber
Adrenalin + Kö 592	o,5 µg/ml o,1 . $1o^{-3}$M	122,9 ± 7,9	Adr.(o,5 µg/ml): + Kö (O,1 . $1o^{-3}$M): +
Adrenalin + Kö 592	o,5 µg/ml o,5 . $1o^{-3}$M	93,5 ± 2,4	Adr.(o,5 µg/ml): - Kö (o,5 . $1o^{-3}$M): +

Tabelle 27: Einfluß von Adenosin und Adenosinderivaten auf die ADP-abhängige Thrombocytenaggregation in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n= 3 - 4 Werte/Gruppe; Berechnung von Dosiswirkungsgeraden]

Substanz	Konzentration ($\cdot 10^{-3}$ M)	Thrombocytenaggregation (% des Kontrollwertes)	Äquieffektive Dosen mit 95 % Vertrauensgrenzen (50 %ige Hemmung der Aggregation)
Adenosin	1,0	94,4 ± 6,4	
	2,5	87,2 ± 0,5	*
	5,0	84,9 ± 2,4	
Isopentenyladenosin [IPA]	1,0	85,5 ± 1,2	
	2,5	58,3 ± 1,8	**
	5,0	9,7 ± 5,1	
trans-Chlor-IPA	1,0	94,6 ± 6,1	
	2,5	71,3 ± 4,1	**
	5,0	17,7 ± 1,2	

Berechnung nicht möglich:

* Dosiswirkungsgerade zeigt keine signifikante Regression
** Dosiswirkungsgerade ist nicht linear

Tabelle 28: Verstärkung der aggregationshemmenden Wirkung von Adenosin und Isopentenyladenosin durch Theophyllin

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; U-Test: Signifikanz : -p>o,o5; +: p<o,o5; ()=Werte/Gruppe]

Substanz	Konzentration [10^{-3} M]	Thrombocyten-aggregation (% des Kontroll-wertes)	Signifikante Abnahme gegenüber
Adenosin	2,5	89,2 ± 1,1 (7)	
	5,o	86,4 ± 1,7 (5)	Aden. (2,5): -
Theophyllin	o,25	92,4 ± 1,o (4)	
	o,5	84,5 ± 5,1 (3)	Theo. (o,25): -
Adenosin + Theophyllin	2,5	41,o ± 4,o (6)	Aden. (2,5): +
			Aden. (5,o): +
	o,25		Theo. (o,25): +
			Theo. (o,5): +
Isopentenyl-adenosin	o,5	91,3 (1)	
	1,o	85,5 ± 1,2 (3)	
Theophyllin	o,25	92,4 ± 1,o (4)	keine
	o,5	84,5 ± 5,1 (3)	statistische
			Auswertung
Isopentenyl-adenosin + Theophyllin	o,5	54,9 ± 3,8 (2)	
	o,25		

Tabelle 29: Verstärkung der aggregationshemmenden Wirkung von PGE_1 durch Theophyllin

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Signifikanz: U-Test; -: $p > 0{,}05$, +: $p < 0{,}05$]

Substanz	Konzentration	Thrombocyten-aggregation (% des Kontroll-wertes)	Signifikante Abnahme gegenüber
PGE_1	2 ng/ml	$87{,}1 \pm 1{,}6$ (4)	
	4 ng/ml	$67{,}2 \pm 1{,}7$ (4)	PGE_1 (2 ng/ml): +
Theophyllin	$0{,}25 \cdot 10^{-3}$M	$84{,}6 \pm 2{,}7$ (8)	
	$0{,}5 \cdot 10^{-3}$M	$69{,}9 \pm 2{,}0$ (7)	Theo ($0{,}25 \cdot 10^{-3}$M): +
PGE_1 + Theophyllin	2 ng/ml $0{,}25 \cdot 10^{-3}$M	$23{,}9 \pm 1{,}5$ (5)	PGE_1 (2 ng/ml): + PGE_1 (4 ng/ml): + Theo ($0{,}25 \cdot 10^{-3}$M): + Theo ($0{,}5 \cdot 10^{-3}$M): +
PGE_1	5 ng/ml	$54{,}0 \pm 2{,}6$ (3)	
	10 ng/ml	$38{,}1 \pm 2{,}9$ (3)	PGE_1 (5 ng/ml): +
Theophyllin	$0{,}25 \cdot 10^{-3}$M	$88{,}9 \pm 5{,}1$ (3)	
	$0{,}5 \cdot 10^{-3}$M	$68{,}2 \pm 4{,}0$ (3)	Theo ($0{,}25 \cdot 10^{-3}$): +
PGE_1 + Theophyllin	5 ng/ml $0{,}25 \cdot 10^{-3}$M	$1{,}6 \pm 1{,}6$ (3)	PGE_1 (5 ng/ml) + PGE_1 (10 ng/ml): + Theo ($0{,}25 \cdot 10^{-3}$M): + Theo ($0{,}5 \cdot 10^{-3}$M): +

3.3.1.3. Substanzen mit senkender Wirkung auf die cAMP-Konzentration (durch Aktivitätsabnahme der Adenylatcyclase oder Stimulation der Phosphodiesterase).

Von Verbindungen, die durch Förderung des Abbaus oder Hemmung der Biosynthese zu einer Erniedrigung der cAMP-Konzentration in den Thrombocyten führen, ist aufgrund der bisher dargestellten Befunde eine Erhöhung der Thrombocytenaggregation zu erwarten. Hiermit stimmt überein, daß nach Zusatz von Imidazol, einem 3',5'-AMP-Phosphodiesteraseaktivator (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971; s.d. weit. Lit.), eine dosisabhängige Aggregationssteigerung beobachtet wurde. Mit 5-Methyl-isoxazol-3-carbonsäure ließ sich ein gleicher, allerdings etwas schwächer ausgeprägter Effekt erzielen (Tabelle 3o). Diese Verbindung ist als Hemmstoff der Lipolyse im Fettgewebe bekannt und übt diese Wirkung nach Befunden von SCHWABE und EBERT (1969) wie Imidazol durch Aktivierung der Phosphodiesterase aus.
Insulin, dessen Stoffwechseleffekt in der Leber und im Fettgewebe aufgrund einer Hemmung der Adenylatcyclase (JUNGAS, 1966; HEPP, 1971) und/oder Aktivitätszunahme der 3',5'-AMP-Phosphodiesterase (SENFT, SCHULTZ, MUNSKE und HOFFMANN, 1968) mit einer Abnahme der cAMP-Konzentration einhergehen, hatte dagegen an Thrombocyten keine Beeinflussung der Aggregation zu Folge (Tabelle 24).

3.3.2. Beeinflussung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation durch Acetylcholin, cGMP und andere cAMP-Analoga.

Außer cAMP wurde mit Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP, 3',5'-GMP) ein zweites cyclisches Nucleotid in der Natur, auch beim Warmblüter, nachgewiesen. Es wird sowohl durch spezifische Enzyme gebildet als auch abgebaut und stellt möglicherweise neben cAMP eine weitere intracelluläre Botensubstanz (''messenger'') dar (HARDMAN, 1971). U.a. wurden Beziehungen zu den F-Prostaglandinen (KUEHL, 1972, 1973 und zum Acetylcheolin (GEORGE, POLSON, O'TOOLE und GOLDBERG, 197o; SCHULTZ, 1972, s. dort weit. Lit.) beobachtet.
Um festzustellen, ob das cGMP-System ebenso wie cAMP für die Thrombocytenaggregation von Bedeutung ist und möglicherweise einen Angriffspunkt der Sulfonylharnstoffe darstellt, wurde der Einfluß von cGMP und Acetylcholin auf die Aggregation der Blutplättchen untersucht. Wegen der im Vergleich zu cAMP besseren Lipoidlöslichkeit wurde von cGMP nicht das entsprechende Dibutyrylderivat, sondern die natürliche unveresterte Substanz verwendet. In diese Prüfung wurden weitere cAMP-Analoga eingeschlossen, deren natürlich Existenz nicht bewiesen ist, aber z.T. aufgrund der Existenz von Phosphodiesterasen mit hoher Affinität zu ihnen (Uridin-3',5'-monophosphat, cUMP: HARDMAN und SUTHERLAND, 1965; KLOTZ und STOCK, 1971) nicht ausgeschlossen erscheint.
Es zeigte sich, daß weder Acetylcholin und cGMP, noch cUMP die Thrombocytenaggregation beeinflussen. Lediglich Inosin-3',5'-monophosphat (cIMP) führte wie auch an anderen Geweben (LOSERT, JAHN und LOGE, 1973, s. dort weit. Lit.) zu einer cAMP-artigen Verminderung der Thrombocytenaggregation (Tabelle 31).

Tabelle 3o: Einfluß von Imidazol und 5-Methylisoxazol-3-carbonsäure auf die Thrombocytenaggregation in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()-Werte/Gruppe; Statistik: U-Test; -:p>o,o5, +: p<o,o5]

Substanz	Konzentration [10^{-3}M]	Thrombocyten-aggregation (% des Kontroll-wertes)	Signifikante Differenz gegenüber
Imidazol	o,25	146,9 ± 3,1 (2)	
	o,5	174,6 ± 5,7 (8)	
	1	277,3 ±13,5 (5)	Imid. o,5: +
5-Methyl-isoxazol-3-carbonsäure	5	185,o ±17,5 (4)	Imid. o,5: - Imid. 1,o: +

Tabelle 31: Einfluß von Acetylcholin und Analoga von cAMP auf die Thrombocytenaggregation in vitro

$[\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test; -:p>o,o5; +:p<o,o5]

Substanz	Konzentration	Thrombocyten-aggregation (% des Kontroll-wertes)	Signifikante Abnahme gegenüber
Acetylcholin	1 µg/ml	1oo,2 ± 1,3 (6)	
cGMP*	o,5 . $1o^{-3}$M	1o3,4 ± 2,9 (4)	
	1 . $1o^{-3}$M	1o3,3 ± 1,3 (4)	o,5 . $1o^{-3}$M: -
cUMP	o,5 . $1o^{-3}$M	1o1,9 ± 2,2 (4)	
	1 . $1o^{-3}$M	97,2 ± 1,3 (4)	o,5 . $1o^{-3}$M: -
cIMP	o,5 . $1o^{-3}$M	54,6 ± 1,1 (4)	
	1 . $1o^{-3}$M	25,7 ± 1,8 (4)	o,5 . $1o^{-3}$M: +

* cGMP beeinflußte auch in niedrigeren Konzentrationen ($5 \cdot 1o^{-7}$M, $1o^{-6}$M, $5.1o^{-6}$M, $1o^{-5}$M, $5.1o^{-5}$M, n=1) nicht die ADP-abhängige Thrombocytenaggregation

Aus diesem Grunde erscheint es auch unwahrscheinlich, daß cGMP in die aggregationshemmende Wirkung der Sulfonylharnstoffe eingeschaltet ist.

3.3.3. Beeinflussung des aggregationshemmenden Effekts von Sulfonylharnstoffen durch Substanzen mit nachgewiesener Wirkung auf das cAMP-System

Zur Charakterisierung möglicher Beziehungen zwischen dem cAMP-System und dem Angriffspunkt der Sulfonylharnstoffe wurde eine gegenseitige spezifische Beeinflussung des Hemmeffektes verschiedener Vertreter dieser Substanzklasse und der Wirkung von Substanzen mit nachgewiesener Beteiligung des cAMP-Systems (Imidazol, Theophyllin und PGE_1) untersucht.

Dabei galten folgende Überlegungen: Eine spezifische Aufhebung des Sulfonylharnstoffeffektes durch den Phosphodiesteraseaktivator Imidazol würde grundsätzlich auf einen Angriff der Antidiabetica am cAMP-System hinweisen. Eine Potenzierung (=überadditive Verstärkung) der Sulfonylharnstoffwirkung durch Theophyllin, einen Phosphodiesterasehemmstoff, wäre mit einer Stimulation der cAMP-Synthese durch die ß-cytotropen Substanzen vereinbar. Falls ein derartiger Effekt durch α-oder ß-Receptorenblocker spezifisch modifiziert würde, ließe sich daraus auf eine Beeinflussung der Adenylatcyclase über adrenerge Receptoren schließen. Eine Potenzierung der aggregationshemmenden Wirkung von PGE_1 durch Sulfonylharnstoffe würde schließlich auf eine theophyllinartige Hemmung des cAMP-Abbaus hinweisen.

Zwischen verschiedenen ß-cytotropen Sulfonamidderivaten bestehen hinsichtlich des Ablaufes ihrer blutzuckersenkenden Wirkung Differenzen. So zeichnen sich z.B. Glibenclamid und ZK 28 2oo gegenüber Tolbutamid und Glisoxepid durch einen (auch bei i.v. Injektion) langsamer einsetzenden, aber dafür länger anhaltenden Effekt aus (SCHÖFFLING, HAUPT, KÖBERICH und BEYER, 1973; LOSERT, 1974; LOSERT und BLUMENBACH, 1974).
Da diese Unterschiede möglicherweise Ausdruck nicht einheitlicher Wirkungsmechanismen sind, wurden die beschriebenen Untersuchungen i.a. mit mindestens je einem Vertreter der beiden Sulfonylharnstoffklassen durchgeführt. Um die Spezifität der beobachteten Effekte beurteilen zu können, wurde außerdem in Parallelversuchen auch Acetylsalicylsäure untersucht. Für diese Verbindung wird ein anderer Wirkungsmechanismus angenommen.

3.3.3.1. Sulfonylharnstoffe und Imidazol

Wie aus der Tabelle 32 hervorgeht, wurde die aggregationshemmende Wirkung aller untersuchten Sulfonylharnstoffe (Glisoxepid, Tolbutamid, Glibenclamid) durch Imidazol aufgehoben. Da auch die durch PGE_1, Isopropylnoradrenalin und Theophyllin verursachte Einschränkung der Thrombocytenaggregation bei Zusatz von Imidazol stark eingeschränkt oder verhindert wurde, wäre dieser Befund durchaus mit einem Angriff von Sulfonylharnstoffen am cAMP-System vereinbar.

Tabelle 32: Beeinflussung der Thrombocytenaggregation durch ß-cytotrope Substanzen und Imidazol in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p>o,o5;+: p<o,o5]

Substanz	Konzentration [$1o^{-3}$M]	Thrombocyten-aggregation (% Kontrollen)	Signifikanter Unterschied gegenüber
Glisoxepid	2,5	71,2 ± 5,1 (6)	
Imidazol	o,5	169,3 ± 4,6 (8)	Glis.: +
Imidazol + Glisoxepid	o,5 2,5	115,2 ± 7,3 (7)	Glis.: + Imid.: +
Tolbutamid	2,5	77,1 ± 1,9 (4)	
Imidazol	o,5	174,4 ± 4,o (5)	Tolb.: +
Imidazol + Tolbutamid	o,5 2,5	123,5 ± 8,4 (4)	Tolb.: + Imid.: +
Glibenclamid	o,5	99,4 ± 5,2 (4)	
Imidazol	o,5	182,8 ± 4,5 (5)	
Imidazol + Glibenclamid	o,5 o,5	138,2 ± 7,4 (3)	Glib.: + Imid.: +

Ein schlüssiger Beweis für eine direkte Steigerung der cAMP-Konzentration durch die untersuchten Antidiabetica läßt sich hieraus aber nicht ableiten, da auch der aggregationshemmende Effekt von Acetylsalicylsäure durch Imidazol fast vollständig aufgehoben wurde (Tabelle 33). Diese Substanz steht mit dem cAMP-System höchstens indirekt über eine Hemmung der Prostaglandin (E_2)-Synthese in Verbindung.

3.3.3.2. Sulfonylharnstoffe und Theophyllin

Eine Stimulation der Adenylatcyclase durch Sulfonylharnstoffderivate erscheint unwahrscheinlich. Der Effekt der beiden untersuchten Antidiabetica (Glisoxepid und Glibenclamid) wurde durch Theophyllin nicht potenziert (überadditiv verstärkt). Die Wirkung der Kombination zwischen Theophyllin und dem jeweiligen Antidiabeticum war nicht stärker als eine Verdoppelung der Konzentration beider Einzelsubstanzen (Tabelle 34).Die Sulfonylharnstoffe verhielten sich in dieser Beziehung wie Acetylsalicylsäure, von der eine Stimulation der Adenylatcyclase nicht zu erwarten ist (Tabelle 35). Auch hier war nur eine Addition des aggregationshemmenden Effekts mit der Theophyllinwirkung erkennbar.

3.3.3.3. Sulfonylharnstoffe und α- oder ß-Receptorenblocker

Aufgrund von Untersuchungen zum Mechanismus des ß-cytotropen und antilipolytischen Effekts von Sulfonylharnstoffderivaten wurden catecholaminähnliche Beziehungen dieser Substanzen zu adrenergen Receptoren vermutet (CORDES, BEYER, SELL, HAUPT und SCHÖFFLING, 1972; ROSAK, BARTELT, HAUPT, BEYER und SCHÖFFLING, 1972). Da Catecholamine die cAMP-Synthese über ß- und möglicherweise auch α-Receptoren antagonistisch beeinflussen (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971; LOSERT, 1973; s. dort jeweils weit. Lit.) wäre daraus ein spezifischer Angriff der Sulfonamidantidiabetica an der Adenylatcyclase abzuleiten.

In Übereinstimmung mit den unter 3.3.3.2. erwähnten Kombinationsversuchen (Sulfonylharnstoffe + Theophyllin) konnte an Thrombocyten kein derartiger Zusammenhang beobachtet werden. Die aggregationshemmende Wirkung von Glisoxepid zeigte keinerlei Übereinstimmung mit dem bereits beschriebenen Effekt von Adrenalin (s. 3.3.1.2.). Es war weder eine Abschwächung der Hemmwirkung durch Zusatz eines ß-Receptorenblockers (Methylphenoxyisopropylaminopropanol, Kö 592) zu erkennen (Tabelle 36), noch wurde der Glisoxepideffekt durch den α-Receptorenblocker Phentolamin spezifisch, d.h. überadditiv, verstärkt (Tabelle 37).

Tabelle 33: Einfluß von Imidazol auf die aggregationshemmende Wirkung von PGE_1, Theophyllin, Isopropylnoradrenalin und Acetylsalicylsäure in vitro.

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: +: $p<0,05$; (+):$p<0,1$]

Substanz	Konzentration	Thrombocyten-aggregation (% Kontroll-wert)	Signifikanter Unterschied gegenüber
Imidazol	$0,5 - 10^{-3}$ M	174,4 ± 4,0 (5)	
PGE_1	5 ng/ml	50,6 ± 3,4 (3)	Imi.: +
Theophyllin	$1 \cdot 10^{-3}$ M	50,7 ± 5,2 (4)	Imi.: +
Acetylsalicylsäure	$2,5 - 10^{-3}$ M	42,0 ± 1,4 (4)	Imi.: +
PGE_1 + Imidazol	5 ng/ml $0,5 \cdot 10^{-3}$ M	93,2 ± 10,2 (4)	PGE_1: (+) Imi.: +
Theophyllin + Imidazol	$1 \cdot 10^{-3}$ M $0,5 \cdot 10^{-3}$ M	88,9 ± 6,0 (4)	Theo.: + Imi.: +
Acetylsalicylsäure + Imidazol	$2,5 \cdot 10^{-3}$ M $0,5 \cdot 10^{-3}$ M	87,9 ± 2,4 (4)	Acet.: + Imi.: +
Imidazol	$0,5 - 10^{-3}$ M	182,8 ± 4,5 (5)	
Isopropylnoradrenalin	$2,5 \cdot 10^{-7}$ M	40,4 ± 1,9 (4)	Imi.: +
Isopropylnoradrenalin + Imidazol	$2,5 \cdot 10^{-7}$ M $0,5 \cdot 10^{-3}$ M	113,0 ± 5,7 (4)	Isopr.: + Imi.: +

Tabelle 34: Einfluß von Theophyllin auf die aggregationshemmende Wirkung ß-cytotroper Substanzen in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p>o,o5;+:p<o,o5]

Substanz	Konzentration [10^{-3}M]	Thrombocyten-aggregation (% des Kontroll-wertes)	Signifikante Abnahme gegenüber
Theophyllin	o,25	85,6 ± 4,o (4)	
	o,5	7o,3 ± 2,6 (4)	Theo. o,25: +
Tolbutamid	1,o	94,8 ± 1,9 (4)	
	2,o	8o,4 ± 3,9 (4)	Tol. 1,o: +
Glibenclamid	o,5	83,o ± 3,2 (3)	
	1,o	66,5 ± 1,8 (3)	Glib. o,5: +
Tolbutamid	1,o	84,3 ± 3,2 (4)	Theo. o,25: -
+ Theophyllin	o,25		Theo. o,5: -
			Tol. 1,o: +
			Tol. 2,o: -
Glibenclamid	o,5	75,5 ± 2,3 (3)	Theo. o,25: -
+ Theophyllin	o,25		Theo. o,5: -
			Glib. o,5: -
			Glib. 1,o: -
Theophyllin	o,25	82,1 ± 2,9 (5)	
	o,5	71,1 ± 2,1 (4)	Theo. o,25: +
Glisoxepid	2,5	69,3 ± 2,o (4)	
	5,o	54,6 ± 2,1 (4)	Glis. 2,5: +
Glisoxepid	2,5	59,6 ± 4,5 (4)	Theo. o,25: +
+ Theophyllin	o,25		Theo. o,5: +
			Glis. 2,5: +
			Glis. 5,o: -

Tabelle 35: Einfluß von Theophyllin auf die aggregationshemmende Wirkung von Acetylsalicylsäure in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=3 Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p>o,o5; +:p<o,o5

Substanz	Konzentration [10^{-3}M]	Thrombocyten-aggregation (% des Kontroll-wertes)	Signifikante Abnahme gegenüber
Theophyllin	o,25	86,1 ± 2,6	
	o,5o	73,5 ± 1,2	Theo. o,25: +
Acetylsali-cylsäure	1,25	77,1 ± 2,7	
	2,5	51,o ± 5,4	Acet. 1,25: +
Acetylsali-cylsäure + Theophyllin	1,25	61,7 ± 3,1	Theo. o,25: + Theo. o,5o: + Acet. 1,25: + Acet. 2,5 : -
	o,25		

Tabelle 36: Einfluß von Kö 592 (Methylphenoxyisopropylaminopropanol) auf die aggregationshemmende Wirkung von Glisoxepid in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()-Werte/Gruppe; Statistik: U-Test; -:p>o,o5, +:p<o,o5]

Substanz	Konzentration [10^{-3}M]	Thrombocyten-aggregation (% des Kontroll-wertes)	Signifikanter Anstieg gegenüber
Glisoxepid	2,5	61,1 ± 2,4 (3)	
Kö 592	o,1 o,2	89,8 ± 2,6 (3) 82,9 ± 2,9 (3)	
Glisoxepid + Kö 592	2,5 o,1	56,6 ± 2,4 (4)	Glis.: -

Tabelle 37: Einfluß von Phentolamin auf die aggregationshemmende Wirkung von Glisoxepid in vitro

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:$p \geq 0{,}05$; +: $p < 0{,}05$]

Substanz	Konzentration [10^{-3}M]	Thrombocyten-aggregation (% des Kontroll-wertes)	Signifikante Abnahme gegenüber
Glisoxepid	2,5	84,6 ± 0,6 (4)	
	5,0	64,2 ± 0,3 (4)	Glis. 2,5: +
Phentolamin	0,1	80,4 ± 2,8 (4)	
	0,2	57,7 ± 0,8 (4)	Phent.0,1: +
Glisoxepid + Phentolamin	2,5 + 0,1	55,2 ± 1,7 (4)	Glis. 2,5: + Glis. 5,0: + Phent.0,1: + Phent.0,2: -

3.3.3.4. Sulfonylharnstoffe und PGE_1

Eine Hemmung des cAMP-Abbaus muß im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Mechanismen dagegen als Angriffspunkt von Sulfonylharnstoffen angenommen werden, allerdings nicht für alle Vertreter dieser Substanzklasse. Tolbutamid und Glisoxepid hatten keine Potenzierung der durch PGE_1 bedingten Aggregationshemmung zur Folge. Ihr Hemmeffekt addierte sich nur zur PGE_1-Wirkung (Tabelle 38, oberer und mittlerer Teil) und verhielt sich damit wie der Effekt von Acetylsalicylsäure (Tabelle 40).

Dagegen war bei Zusatz von PGE_1 und Glibenclamid eine überadditive Verstärkung der jeweiligen Einzelwirkungen beider Verbindungen festzustellen (Tabelle 38, unterer Teil). Andeutungsweise war bei einem von drei unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Versuchen mit ZK 28 2oo ein ähnliches Verhalten zu erkennen. Die Kombination von PGE_1 (2 ng/ml) und ZK 28 2oo ($o,5 \cdot 1o^{-3}$ M) übertraf in ihrer hemmenden Wirkung zwar signifikant den Effekt der doppelten Dosis des Prostaglandins (4 ng/ml), lag aber nur in der gleichen Größenordnung wie der bei doppelter Konzentration des Antidiabeticums ($1 \cdot 1o^{-3}$ M) gemessene Wert (Tabelle 39).

Es wurde bereits erwähnt, daß ZK 28 2oo und Glibenclamid auch in Bezug auf ihre Beeinflussung der Blutglucose ein anderes Wirkungsbild zeigen als Tolbutamid und Glisoxepid.

3.3.4. Einfluß von Sulfonylharnstoffen auf die cAMP-Konzentration in Thrombocyten (TRP)

Um die bei der Bestimmung der Thrombocytenaggregation erhobenen Befunde über eine Beteiligung des cAMP-Systems an der Wirkung der untersuchten Antidiabetica, insbesondere die Unterschiede zwischen den verschiedenen Sulfonylharnstofftypen abzusichern, wurde unter nahezu gleichen Versuchsbedingungen die cAMP-Konzentration der Thrombocyten gemessen. Auch hierbei wurde zunächst der Einfluß von Standardsubstanzen mit nachgewiesenem Effekt auf das cAMP-System untersucht. Wegen der im einzelnen nicht geklärten Beziehungen zwischen dem aggregationsfördernden Effekt von PGE_2 (in hohen Konzentrationen auch $PGF_{2\alpha}$) sowie der aggregationsauslösenden Wirkung von ADP und dem cAMP-Stoffwechsel wurden auch diese Verbindungen in die Experimente einbezogen. Das gleiche galt für Acetylsalicylsäure, da diese Verbindung über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese ebenfalls mit dem cAMP-System in Verbindung stehen könnte. Bei den Versuchen mit Sulfonylharnstoffen beschränkte sich die Prüfung auf Tolbutamid, Glisoxepid, Glibenclamid und ZK 28 2oo.

Tabelle 38: Einfluß von Tolbutamid, Glisoxepid und Glibenclamid auf die aggregationshemmende Wirkung von PGE_1

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p>o,o5, +:p<o,o5]

Substanz	Konzentration	Thrombocyten-aggregation (% Kontroll-wert)	Signifikante Abnahme gegenüber
PGE_1	2 ng/ml	86,4 ± 3,2 (5)	
	4 ng/ml	73,7 ± 4,3 (5)	PGE_1 (2 ng/ml): +
Tolbutamid	1,25 . 10^{-3}M	100,1 ± 3,6 (5)	
	2,5 . 10^{-3}M	83,4 ± 4,9 (5)	Tol. (1,25 . 10^{-3}M): +
PGE_1 + Tolbutamid	2 ng/ml + 1,25 . 10^{-3}M	87,8 ± 2,5 (5)	PGE_1 (2 ng/ml): - PGE_1 (4 ng/ml): - Tol. (1,25 . 10^{-3}M): + Tol. (2,5 . 10^{-3}M): -
PGE_1	2 ng/ml	84,8 ± 2,5 (9)	
	4 ng/ml	67,9 ± 2,4 (8)	PGE_1 (2 ng/ml): +
Glisoxepid	1,25 . 10^{-3}M	88,5 ± 1,3 (8)	
	2,5 . 10^{-3}M	75,5 ± 3,4 (7)	Glis. (1,25 . 10^{-3}M): +
PGE_1 + Glisoxepid	2 ng/ml + 1,25 . 10^{-3}M	72,2 ± 1,5 (8)	PGE_1 (2 ng/ml): + PGE_1 (4 ng/ml): - Glis.(1,25 . 10^{-3}M): + Glis.(2,5 . 10^{-3}M): -
PGE_1	2 ng/ml	84,3 ± 2,8 (7)	
	4 ng/ml	59,5 ± 3,4 (7)	PGE_1 (2 ng/ml): +
Glibenclamid	o,5 . 10^{-3}M	88,9 ± 2,7 (7)	
	1,o . 10^{-3}M	74,1 ± 4,o (6)	Glib. (o,5 . 10^{-3}M): +
PGE_1 + Glibenclamid	2 ng/ml + o,5 . 10^{-3}M	42,8 ± 4,3 (8)	PGE_1 (2 ng/ml): + PGE_1 (4 ng/ml): - Glib. (o,5 . 10^{-3}M): + Glib. (1,o . 10^{-3}M): +

Tabelle 39: Einfluß von ZK 28 2oo auf die aggregationshemmende Wirkung von PGE_1

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test; -:p>o,o5; +:p<o,o5]

Substanz	Konzentration	Thrombocyten-aggregation (% Kontrollen)	Signifikante Abnahme gegenüber
PGE_1	2 ng/ml	82,4 ± 3,o (4)	
	4 ng/ml	64,1 ± 2,6 (4)	PGE_1 (2 ng/ml): +
ZK 28 2oo	o,5 . $1o^{-3}$M	81,o ± 2,2 (4)	
	1,o . $1o^{-3}$M	56,8 ± 1,9 (4)	ZK 28 2oo ($o,5 . 1o^{-3}$M): +
PGE_1 + ZK 28 2oo	2 ng/ml + o,5 . $1o^{-3}$M	51,o ± 2,5 (5)	PGE_1 (2 ng/ml):+ PGE_1 (4 ng/ml):+ ZK 28 2oo ($o,5 . 1o^{-3}$M):+ ($1 . 1o^{-3}$M):-
PGE_1	2 ng/ml	85,6 ± 9,8 (4)	
	4 ng/ml	54,8 ± 5,8 (4)	PGE_1 (2 ng/ml): +
ZK 28 2oo	o,25 . $1o^{-3}$M	91,3 ± 5,5 (4)	
	o,5 . $1o^{-3}$M	84,7 ± 3,7 (6)	ZK 28 2oo ($o,25 . 1o^{-3}$M): -
PGE_1 + ZK 28 2oo	2 ng/ml + o,25 . $1o^{-3}$M	61,7 ± 3,o (4)	PGE_1 (2 ng/ml): + PGE_2 (4 ng/ml): - ZK 28 2oo ($o,25 . 1o^{-3}$M): + ($o,5 . 1o^{-3}$M): +
PGE_1	3,3 ng/ml	65,2 ± 5,4 (3)	
	6,6 ng/ml	42,9 ± 3,3 (3)	PGE_1 (3,3 ng/ml): +
ZK 23 2oo	o,25 . $1o^{-3}$M	91,3 ± 5,5 (4)	
	o,5o . $1o^{-3}$M	84,7 ± 3,7 (6)	ZK 282oo ($o,25 . 1o^{-3}$M): -
PGE_1 + ZK 28 2oo	3,3 ng/ml + o,5 . $1o^{-3}$M	52,6 ± 2,3 (3)	PGE_1 (3,3 ng/ml): + PGE_1 (6,6 ng/ml): - ZK 28 2oo ($o,25 . 1o^{-3}$M): + ($o,5 . 1o^{-3}$M): +

Tabelle 4o: Einfluß von Acetylsalicylsäure auf die aggregationshemmende Wirkung von PGE_1

$[\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test; -:p>o,o5; +:p<o,o5]

Substanz	Konzentration	Thrombocyten-aggregation	Signifikante Abnahme gegenüber
PGE_1	2 ng/ml	82,o ± 3,2 (4)	
	4 ng/ml	65,5 ± 1,5 (3)	PGE_1 (2 ng/ml): +
Acetylsalicylsäure	$1,25 . 1o^{-3}$M	77,1 ± 2,7 (3)	
	$2,5 . 1o^{-3}$M	51,o ± 5,4 (3)	Acet. ($1,25 . 1o^{-3}$M): +
PGE_1 + Acetylsalicylsäure	2 ng/ml + $1,25 . 1o^{-3}$M	63,4 ± 4,3 (3)	PGE_1 (2 ng/ml): + PGE_1 (4 ng/ml): - Acet. ($1,25 . 1o^{-3}$M): + Acet. ($2,5 . 1o^{-3}$M): -

3.3.4.1. Beeinflussung der cAMP-Konzentration durch PGE_1, Isopropylnoradrenalin, Theophyllin und Imidazol

PGE_1 und in geringerem Maße Isopropylnoradrenalin steigerten bei Zusatz zu TRP in sicher aggregationshemmenden Konzentrationen die cAMP-Konzentration. Theophyllin hatte in ebenfalls aggregationshemmender Dosis keinen meßbaren Anstieg des cAMP-Gehalts zu Folge, potenzierte aber den Effekt von PGE_1 (Tabelle 41).

In gleicher Weise führte Imidazol in einer Konzentration, die eine starke Zunahme der Thrombocytenaggregation bewirkte (10^{-3} M), nicht zu einer Abnahme des basalen cAMP-Gehalts der Thrombocyten. Dagegen wurde die durch PGE_1 hervorgerufene Erhöhung durch Imidazol geringfügig abgeschwächt. Dieser Effekt war zwar statistisch nicht mit einem Irrtumsrisiko von α=5 % zu sichern. Aufgrund der Verteilung der Einzelwerte (- beide Gruppen überschnitten sich nur mit je einem von vier Werten -) war jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß doch eine Differenz zwischen beiden Kollektiven bestand (Tabelle 42).

3.3.4.2. Beeinflussung der cAMP-Konzentration durch PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, ADP und Acetylsalicylsäure

In einer hohen, die ADP-abhängige Thrombocytenaggregation fast vollständig hemmenden Konzentration (4o µg/ml) steigerte PGE_2 wie PGE_1 den cAMP-Gehalt der Thrombocyten. Dieser Effekt wurde durch Theophyllin verstärkt. Unter dem Einfluß von 1o und 2o µg PGE_2/ml, zwei ebenfalls noch aggregationshemmenden Dosen des Prostaglandins, war keine Zunahme der cAMP-Konzentration mehr gegenüber den Kontrollen festzustellen. In einer noch niedrigeren, die Thrombocytenaggregation sehr stark steigernden Dosis (o,2 µg/ml) lag der cAMP-Gehalt der TRP-Proben unter dem Kontrollniveau. Der gleiche Effekt wurde nach Zusatz von $PGF_{2\alpha}$ in einer aggregationsfördernden Konzentration (1o µg/ml) beobachtet (Tabelle 43).

ADP, das die Aggregation der Blutplättchen auslöst und nicht nur steigert, führte nicht zu einer relevanten Veränderung der cAMP-Konzentration. Auch Acetylsalicylsäure übte in einer Dosis, die den PGE_2-Gehalt und die Thrombocytenaggregation erniedrigte, weder mit noch ohne Zusatz von ADP einen Eigeneffekt auf die Konzentration des cyclischen Nucleotids aus und verstärkte auch nicht die steigernde Wirkung von PGE_1 (Tabelle 44).

Die unterschiedliche Höhe der cAMP-Konzentration in den Kontrollansätzen der einzelnen Experimente erklärt sich durch die differierende Thrombocyten-Konzentration der verschiedenen TRP-Präparationen. Entsprechendes gilt auch für die auf den Tabellen 41, 42, 45 und 46 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 41: Einfluß von PGE_1, Isopropylnoradrenalin und Theophyllin auf die cAMP-Konzentration von Ratten-Thrombocyten (in vitro-Versuch mit TRP)

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=4(3)Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p>o,o5, +: p<o,o5]

Substanz	Konzentration	cAMP (pmol/ml TRP)	Signifikante Zunahme gegenüber
Kontrollen	---	25,9 ± 4,7	
PGE_1	2o ng/ml	52,7 ± 5,8	Kontr.: +
Theophyllin	o,5 . $1o^{-3}$M	28,2 ± 5,1	Kontr.: -
PGE_1 + Theophyllin	2o ng/ml o,5 . $1o^{-3}$M	98,1 ± 9,o	Kontr.: + PGE_1: + Theo.: +
Kontrollen	---	28,7 ± 2,4 (3)	
Isopropyl-noradrenalin	2,5 . $1o^{-6}$M	41,9 ± 2,2	Kontr.: +

Tabelle 42: Einfluß von Imidazol auf die cAMP-Konzentration von Ratten-Thrombocyten (in vitro-Versuch mit TRP)

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p>0,05, +:p<0,05]

Substanz	Konzentration	cAMP (pmol/ml TRP)	Signifikante Abnahme gegenüber
Kontrollen	---	36,6 ± 4,0 (8)	
Imidazol	10^{-3} M	37,7 ± 2,7 (8)	Kontr.: -
Kontrollen	---	28,7 ± 2,4 (3)	
PGE_1	20 ng/ml	112,2 ± 9,1 (4)	
PGE_1 + Imidazol	20 ng/ml 10^{-3} M	93,9 ± 3,0 (4)	PGE_1: -

Tabelle 43: Einfluß von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ auf die cAMP-Konzentration von Ratten-Thrombocyten (in vitro-Versuche mit TRP bei z.T. gleichzeitiger Messung der durch ADP induzierten Aggregation)

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ()=Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p>0,05, +:p<0,05]

Substanz	Konzentration	cAMP (pmol/ml TRP)	Signifikanz	Thrombocytenaggregation (% Kontrollwert)
Kontrollen	---	49,2 ± 1,6 (3)		———
$PGF_{2\alpha}$	10 µg/ml	27,6 ± 1,0 (3)	<Ko: +	219,3 ± 18,1
PGE_2	0,2 µg/ml	32,5 ± 6,6 (3)	<Ko: +	173,9 ± 10,0
	10 µg/ml	53,2 ± 0,4 (3)	>Ko: + >PGE_2 (0,2): +	17,8 ± 2,2
Kontrollen	---	36,6 ± 4,0 (8)		———
PGE_2	20 µg/ml	47,7 ± 4,6 (4)	>Ko: -	———
Kontrollen	---	17,6 ± 8,1 (4)		———
PGE_2	40 µg/ml	212,9 ±28,4 (4)	>Ko: +	———
PGE_2 + Theophyllin	40 µg/ml 0,5 . 10^{-3} M	333,0 ±29,8 (4)	>Ko: + >PGE_2:+	———

Tabelle 44: Einfluß von ADP und Acetylsalicylsäure auf die cAMP-Konzentration von Ratten-Thrombocyten (in vitro-Versuche mit TRP)

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=4 (3) Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:$p > 0{,}05$, +:$p < 0{,}05$]

Substanz	Konzentration	cAMP (pmol/ml TRP)	Signifikante Differenz gegenüber
Kontrollen	---	25,9 ± 4,7	
Acetylsalicylsäure	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$ M	2o,2 ± 3,4	Ko: -
PGE_1	2o ng/ml	52,7 ± 5,8	Ko: +
PGE_1 + Acetylsalicylsäure	2o ng/ml $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ M	51,8 ± 3,3	Ko: + Acet.: + PGE_1: -
Kontrollen		28,7 ± 2,4 (3)	
ADP	$2{,}5 \cdot 10^{-6}$ M	34,4 ± 2,7	Ko: -
Acetylsalicylsäure + ADP	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$ M $2{,}5 \cdot 10^{-6}$ M	28,4 ± o,7	Ko: - ADP: -

3.3.4.3. Beeinflussung der cAMP-Konzentration durch Tolbutamid, Glisoxepid, Glibenclamid und ZK 28 2oo

Alle vier untersuchten Sulfonylharnstoffderivate hatten bei alleinigem Zusatz in aggregationshemmenden Konzentrationen keine Zunahme des cAMP-Gehalts der Thrombocyten zur Folge. Glisoxepid verstärkte auch nicht den durch PGE_1 hervorgerufenen cAMP-Anstieg. Unter dem Einfluß von Tolbutamid und ZK 28 2oo war eine geringe Zunahme der cAMP-steigernden Wirkung des Prostaglandins zu erkennen. Eine weit über den Theophyllineffekt (s.Tabelle 41) hinausgehende Potenzierung der PGE_1-Wirkung wurde dagegen durch Glibenclamid verursacht; die 3',5'-cAMP-Konzentration des TRP nahm auf das dreifache des Prostaglandinwertes zu. Glibenclamid verhielt sich damit eindeutig wie ein Hemmstoff der 3',5'-AMP-Phosphodiesterase (Tabelle 45, Tabelle 46).

Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Resultaten, die unter fast gleichen experimentellen Bedingungen bei der Messung der Thrombocytenaggregation erzielt wurden. Unter Berücksichtigung der an beiden Versuchsmodellen erzielten Ergebnisse scheint eine deutliche Differenz zwischen Glisoxepid und Glibenclamid zu bestehen, während die beiden anderen Verbindungen Zwischenstellungen einnehmen. Tolbutamid dürfte dabei mehr dem Glisoxepid, ZK 28 2oo eher dem Glibenclamid ähneln.

3.4. Beziehungen zwischen dem cAMP-System und dem ß-cytotropen Effekt verschiedener Sulfonylharnstoffe

Die in vitro an Thrombocyten beobachteten Unterschiede in der Beeinflussung des cAMP-Systems und damit wahrscheinlich im Mechanismus der Aggregationshemmung durch verschiedene Sulfonylharnstoffe veranlaßten zu der Frage, ob möglicherweise auch am ß-cytotropen Effekt dieser Substanzklasse unterschiedliche Mechanismen beteiligt sind. Frühere in vivo-Untersuchungen zur Insulinsekretion hatten deutliche Unterschiede zwischen der Wirkung von Glucagon und Isopropylnoradrenalin einerseits und Glymidin-Natrium, Glisoxepid und - soweit untersucht - auch Tolbutamid andererseits ergeben, die eindeutig gegen eine Mitwirkung des cAMP-Systems am Effekt dieser Sulfonylharnstoffderivate sprachen (LOSERT, LOGE und JAHN, 1973; MORCZINNECK, 1971; LOSERT, SCHOLZ, SCHILLINGER und LOGE, 1973). Glibenclamid und ZK 28 2oo wurden bei diesen Experimenten nicht mitgeprüft. Aufgrund der in vitro und unter geeigneten Versuchsbedingungen in vivo beobachteten Unterschiede in der Kinetik der Insulinsekretion (Glibenclamid) (SCHÖFFLING, HAUPT, KÖBERICH und BEYER, 1973) bzw. im Ablauf der Blutzuckersenkung (ZK 28 2oo) (LOSERT, 1974; LOSERT und BLUMENBACH, 1974) wäre es durchaus möglich, daß diese Verbindungen sich anders verhalten.

Bedingt durch den jeweiligen Angriffspunkt im Sekretionsmechanismus besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen den ß-cytotropen Effekten von cAMP einerseits und Sulfonylharnstoffen wie Tolbutamid sowie Glisoxepid andererseits in der verschiedenartigen Abhängigkeit ihrer Wirkungen von der Glucosekonzentration: Sulfonylharnstoffderivate steigern Effekte niedriger und mittlerer Glucosekonzentrationen, erhöhen aber nicht den durch Glucose verursachten Maximaleffekt, während Verbindungen, die den cAMP-Gehalt erhöhen, auch die Wirkung hoher Glucosekonzentrationen noch verstärken (LOSERT, LOGE und JAHN, 1973; s.dort auch weit.Lit.).

Tabelle 45: Einfluß von Tolbutamid und Glisoxepid auf die cAMP-Konzentration in Ratten-Thrombocyten (in vitro-Versuche mit TRP)

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=4 Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -: $p > 0{,}05$, +: $p < 0{,}05$]

Substanz	Konzentration	cAMP (pmol/ml TRP)	Signifikante Zunahme gegenüber
Kontrollen		15,9 ± 2,8	
Tolbutamid	$1{,}25 \cdot 10^{-3}$ M	13,6 ± 3,7	Kontr.: -
PGE_1	20 ng/ml	40,0 ± 3,6	Kontr.: - Tol.: +
PGE_1 + Tolbutamid	20 ng/ml $1{,}25 \cdot 10^{-3}$ M	64,5 ± 3,5	Tol.: + PGE_1: +
Kontrollen		33,0 ± 7,0	
Glisoxepid	$1{,}25 \cdot 10^{-3}$ M	20,2 ± 6,4	Kontr.: -
PGE_1	20 ng/ml	65,8 ± 8,4	Kontr.: + Glis.: +
PGE_1 + Glisoxepid	20 ng/ml $1{,}25 \cdot 10^{-3}$ M	44,0 ± 10,6	Glis.: - PGE_1: -

Tabelle 46: Einfluß von Glibenclamid und ZK 28 2oo auf die cAMP-Konzentration in Ratten-Thrombocyten (in vitro-Versuche mit TRP)

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=4 (3) Werte/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p> o,o5, +:p< o,o5]

Substanz	Konzentration	cAMP (pmol/ml TRP)	Signifikante Zunahme gegenüber
Kontrollen		33,o ± 7,o	
Glibenclamid	o,5 . $1o^{-3}$M	33,9 ± 8,8	Kontr.: -
PGE_1	2o ng/ml	65,8 ± 8,4	Kontr.: + Glib.: +
PGE_1 + Glibenclamid	2o ng/ml o,5 . $1o^{-3}$M	186,1 ± 17,6	Glib.: + PGE_1: +
Kontrollen		15,9 ± 2,8	
ZK 28 2oo	o,5 . $1o^{-3}$M	16,2 ± 5,2 (3)	Kontr.: -
PGE_1	2o ng/ml	4o,o ± 3,6	Kontr.: + ZK 28 2oo: +
PGE_1 + ZK 28 2oo	2o ng/ml o,5 . $1o^{-3}$M	53,5 ± 2,o	ZK 28 2oo: + PGE_1: +

Da eine Methode zur direkten Analyse der cAMP-Konzentration in den ß-Zellen nicht zur Verfügung stand, wurde die Modifikation des ß-cytotropen Effektes einer in vivo maximal wirksamen Glucosedosis als Indikator für eine Beeinflussung des cAMP-Systems verwendet und nach i.v. Injektion von äquihypoglykämischen Dosen Tolbutamid, Glisoxepid, Glibenclamid und ZK 28 2oo untersucht. Als Vergleichssubstanz diente Theophyllin.

Während Tolbutamid und Glisoxepid den Glucoseeffekt nicht verstärkten, hatten Glibenclamid und ZK 28 2oo eine deutliche Erhöhung der Insulinfreisetzung zur Folge. Sie erreichte allerdings nicht die nach Injektion von Theophyllin gemessenen Werte, wäre aber durchaus mit einer (schwachen) theophyllinartigen Phosphodiesterasehemmung vereinbar (Tabelle 47).

Beeinflussung der cAMP-Konzentration in der Leber und im Serum durch Sulfonylharnstoffe

Im Gegensatz zu den Langerhanschen Inseln ist die Leber, die ebenfalls als Wirkort der Sulfonylharnstoffe diskutiert wird, einer Bestimmung der cAMP-Konzentration in Vivo zugänglich. Es wurde bereits erwähnt, daß diese Substanzen in der Leber die Lipolyse, Ketogenese sowie Gluconeogenese hemmen und die Glycogensynthese steigern. Diese Effekte sind der Wirkung von Hormonen wie Glucagon und Adrenalin (ß-adrenerge Wirkkomponente), die die Adenylatcyclase stimulieren und damit die intracelluläre cAMP-Konzentration steigern, direkt entgegengesetzt. Sie gleichen vielmehr den Stoffwechselveränderungen, die durch Insulin verursacht werden. Insulin und Glucagon werden als physiologische Antagonisten betrachtet, deren Wirkungen mit einer entgegengesetzten Beeinflussung des cAMP-Systems einhergehen (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971; EXTON, LEWIS, HO, ROBISON und PARK, 1971).

Falls Sulfonylharnstoffe überhaupt den Stoffwechsel des cyclischen Nucleotids in der Leber beeinflussen, wäre deshalb von ihrer Wirkung statt einer Steigerung eher eine Erniedrigung der cAMP-Konzentration zu erwarten. Zur Prüfung dieser Frage wurde untersucht, ob nach i.v. Injektion äquihypoglykämischer Dosen verschiedener Sulfonylharnstoffderivate eine (ggf. unterschiedliche) Beeinflussung des cAMP-Gehalts nachweisbar ist. Hierbei wurde sowohl die alleinige Wirkung der Substanzen als auch ihr Einfluß auf die durch Glucagon verursachte cAMP-Erhöhung untersucht. Als Vergleichssubstanzen dienten Verbindungen, von denen aufgrund ihres Angriffspunktes am cAMP-System eine Verstärkung (Theophyllin) oder Verminderung (Imidazol, Insulin) der Glucagonwirkung zu erwarten war.

Die vier untersuchten ß-cytotropen Antidiabetica (Glisoxepid, Tolbutamid, Glibenclamid, ZK 28 2oo) hatten eine geringfügige Abnahme der basalen cAMP-Konzentration zur Folge, führten jedoch

Tabelle 47: Einfluß von Theophyllin und ß-cytotropen Antidiabetica auf die insulinfreisetzende Wirkung von Glucose bei nüchternen Ratten

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=1o Tiere/Gruppe; Statistik: U-Test: -p> o,o5, +:p< o,o5, ++:p< o,o1; Insulinbestimmung im Pfortaderblut, 15 min nach i.v. Injektion der Substanzen]

Behandlung	Dosis	Seruminsulin (µE/ml)	Signifikante Steigerung gegenüber Glucose
Glucose	2 g /kg	38,o ± 8,1	
Glucose + Theophyllin	2 g /kg 1oo mg/kg	148,3 ± 9,5	++
Glucose + Tolbutamid	2 g /kg 5o mg/kg	5o,8 ± 8,3	-
Glucose +Glisoxepid	2 g /kg o,25 mg/kg	3o,4 ± 7,8	-
Glucose + Glibenclamid	2 g /kg o,2 mg/kg	69,2 ± 1o,3	+
Glucose + ZK 28 2oo	2 g /kg o,o4 mg/kg	75,9 ± 12,3	+

nicht zu einer signifikanten Veränderung des Glucagoneffektes (Tabelle 48, Tabelle 49). In Übereinstimmung hiermit wurde auch keine relevante Veränderung der bei einem Experiment parallel registrierten cAMP-Konzentrationen im Serum beobachtet, weder bei alleiniger Injektion der Sulfonylharnstoffe, noch bei kombinierter Gabe mit Glucagon (s.Tabelle 48). Bei diesen Versuchen fiel auf, daß die Wirkung von 0,1 mg/kg Glucagon 10 min nach i.v. Injektion gegenüber dem nach 5 min gemessenen Wert wieder erheblich abgenommen hatte.

In wieweit mit diesen Ergebnissen eine Beeinflussung des hepatischen cAMP-Systems ausgeschlossen werden kann, muß allerdings offen bleiben, da auch die untersuchten Vergleichssubstanzen nicht die bei in vitro-Versuchen beobachteten (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971; EXTON, LEWIS, HO, ROBISON und PARK, 1971) oder zu erwartenden Veränderungen zeigten. Theophyllin hatte weder eine Steigerung des basalen cAMP-Gehaltes zur Folge, noch verstärkte es eindeutig den Effekt von Glucagon (s. Tabelle 48 und 49). Unter dem Einfluß von Imidazol war keine signifikante Verminderung der Glucagonwirkung zu erkennen (s. Tabelle 49), und auch Insulin reduzierte in Dosen bis zu 5 IE/kg (i.v.) weder die basale noch die durch verschiedene Glucagondosen in unterschiedlichem Maße gesteigerte cAMP-Konzentration. Bei einigen Experimenten war eher eine geringfügige Zunahme des cAMP-Gehalts gegenüber den jeweiligen Kontrollen nachzuweisen (Tabelle 5o, Tabelle 51).

Tabelle 48: Einfluß von Glucagon, Theophyllin und B-cytotropen Sulfonylharnstoffderivaten auf den cAMP-Gehalt der Leber und des Serums nüchterner Ratten

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=1o oder () Tiere/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p> o,o5, +:p< o,o5, ++:p< o,o1]

Behandlung	Dosis (mg/kg)	cAMP (Leber) nmol/gFG	Signifikanz gegen	cAMP (Serum) pmol/ml
Bestimmung nach 1o min				
Kontrollen		6,8o ± o,11		19,7 ± o,9
Glucagon	o,1	1,83 ± o,o3	Ko: ++	15,8 ± 1,3 (9)
Theophyllin	1oo	o,91 ± o,1o	Ko: -	19,7 ± 1,8
Tolbutamid	5o	o,28 ± o,o5	Ko: ++	15,o ± 1,3 (3)
Glisoxepid	o,25	o,3o ± o,o5	Ko: ++	13,8 ± 1,1
Glibenclamid	o,2	o,38 ± o,o7	Ko: +	14,8 ± 1,2
ZK 28 2oo	o,o4	o,52 ± o,1o	Ko: -	15,8 ± 1,8
Glucagon + Theophyllin	o,1 1oo	1,87 ± o,14	Ko: ++ Gluc.: -	13,9 ± 1,5 (8)
Glucagon + Tolbutamid	o,1 5o	1,79 ± o,14	Ko: ++ Gluc.: -	18,5 ± 1,6 (8)
Glucagon + Glisoxepid	o,1 o,25	1,75 ± o,13	Ko: ++ Gluc.: -	15,9 ± 2,1 (7)
Glucagon + Glibenclamid	o,1 o,2	1,71 ± o,o9	Ko: ++ Gluc.: -	14,o ± 1,o (3)
Glucagon + ZK 28 2oo	o,1 o,o4	1,74 ± o,o9	Ko: ++ Gluc.: -	13,7 ± 1,o (9)

Tabelle 49: Einfluß von Glucagon, Theophyllin, Imidazol und ß-cytotropen Sulfonylharnstoffderivaten auf den cAMP-Gehalt der Leber nüchterner Ratten

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=5 Tiere/Gruppe; Statistik: U-Test: -:$p > 0{,}05$, +:$p < 0{,}05$, ++:$p < 0{,}01$]

Behandlung	Dosis mg/kg	cAMP (Leber) nmol/g FG	Signifikanz gegen
Bestimmung nach 5 min			
Kontrollen		1,5 ± 0,1	
Glucagon	0,01	43,8 ± 6,7	Ko: ++
Glucagon + Theophyllin	0,01 50	50,6 ± 4,1	Ko: ++ Gluc.: -
Glucagon + Tolbutamid	0,01 50	48,2 ± 2,9	Ko: ++ Gluc.: -
Glucagon + Glibenclamid	0,01 0,5	37,4 ± 6,0	Ko: ++ Gluc.: -
Glucagon + Imidazol	0,01 10	36,9 ± 5,6	Ko: ++ Gluc.: -

Tabelle 5o: Einfluß von Insulin auf den basalen und durch Glucagon erhöhten cAMP-Gehalt der Rattenleber

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$:, n=4 Tiere/Gruppe; Statistik: U-Test: -:$p > 0{,}05$, +:$p < 0{,}05$, Gewebsentnahme: 5 min nach i.v. Injektion]

1. Versuch mit variablen Glucagondosen

Behandlung	Dosis	cAMP (Leber [nmol/g FG]	Signifikanz gegen
Kontrollen		1,38 ± o,12	
Insulin	5 IE /kg	2,29 ± o,o6	ko: +
Glucagon	o,5 µg/kg	1,48 ± o,o8	ko: -
Glucagon + Insulin	o,5 µg/kg 5 IE /kg	1,83 ± o,31	Gluc. o,5: -
Glucagon	1 µg/kg	2,62 ± o,2o	Gluc. o,5: +
Glucagon + Insulin	1 µg/kg 5 IE /kg	3,18 ± o,5o	Gluc. 1,o: -
Glucagon	2 µg/kg	12,8 ± 5,2	Gluc. 1,o: +
Glucagon + Insulin	2 µg/kg 5 IE /kg	25,3 ± 3,4	Gluc. 2,o: -

Tabelle 51: Einfluß von Insulin auf den basalen und durch Glucagon erhöhten cAMP-Gehalt der Rattenleber

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=5(4) Tiere/Gruppe; Statistik: U-Test: -:p o,o5, +:p o,o5; Gewebsentnahme: 5 min nach i.v. Injektion]

2. Versuch mit variablen Insulindosen

Behandlung	Dosis	cAMP (Leber) [nmol/g FG]	Signifikanz gegen
Kontrollen		o,53 ± o,19 (4)	
Glucagon	1o µg /kg	45,4 ± 4,8	kontr.: -
Glucagon + Insulin	1o µg /kg o,25 IE/kg	36,1 ± 3,1	Glucagon: -
Glucagon + Insulin	1o µg /kg 1 IE /kg	46,9 ± 4,8 (4)	Glucagon: -
Glucagon + Insulin	1o µg /kg 5 IE /kg	48,1 ± 7,8	Glucagon: -
Insulin	5 IE /kg	1,11 ± o,13	Kontr.: +

4. Diskussion

4.1. Beeinflussung der Thrombocytenaggregation durch Sulfonylharnstoffe

Nach den vorliegenden Ergebnissen hemmen alle untersuchten blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffe und Sulfonylaminopyrimidine die Thrombocytenaggregation. Daraus kann man schließen, daß Substanzen dieser Struktur grundsätzlich beide Effekte ausüben können. Auch die zweite Gruppe oraler Antidiabetica, die Biguanide, sind nach den mit Phenformin erzielten Ergebnissen Hemmstoffe der Thrombocytenaggregation.

In Bezug auf ihre Wirksamkeit an den ß-Zellen und den Thrombocyten zeigen sich jedoch deutliche Dissoziationen bei verschiedenen Sulfonylharnstoffderivaten. Nicht alle Substanzen mit höherer blutzuckersenkender Wirksamkeit hemmen auch in geringeren Konzentrationen die Thrombocytenaggregation, wie die Beispiele Tolbutamid und Glisoxepid zeigen. Soweit an den Thrombocyten Unterschiede in der relativen Wirksamkeit bestehen, sind sie qualitativ gleichartig quantitativ jedoch geringer als an den ß-Zellen. Als Beispiele seien hier Tolbutamid und Glibenclamid sowie Tolbutamid und ZK 28 2oo genannt. Die für die Bindung (und/oder Wirkung?) verantwortlichen Rezeptoren dürften demnach an beiden Zellsystemen differieren, sich jedoch nicht grundsätzlich voneinander unterscheiden. Dies geht besonders aus dem Vergleich der aggregationshemmenden Wirkungen der beiden isomeren Sulfonylaminopyrimidine ZK 28 2oo und ZK 28 2o1 hervor: Wie an den ß-Zellen ist die S(-)-Form (ZK 28 2oo) auch an den Thrombocyten relativ stärker wirksam als die R(+)-Form (ZK 28 2o1). Allerdings ist auch in diesem Fall der Unterschied in der blutzuckersenkenden Wirksamkeit größer als die Differenz der aggregationshemmenden Potenz.

Soweit die Steuerung der Thrombocytenfunktion durch cAMP und Prostaglandine betroffen ist, lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen ebenfalls keine Anhaltspunkte für grundsätzliche Unterschiede im Angriffspunkt der Sulfonylharnstoffe an den Thrombocyten und ß-Zellen ableiten. Dieser Schluß beruht auf den im folgenden dargelegten Überlegungen.

4.1.1. Beziehungen zwischen Sulfonylharnstoffen und Prostaglandinen

Es wurde bereits erwähnt, daß über den Einfluß der Prostaglandine auf die Insulinsekretion wenig bekannt ist. Eine wesentliche Bedeutung dieser Substanzen für die physiologische Regulation der Insulinsekretion ist aufgrund der bisherigen Informationen unwahrscheinlich. PGE_1 steigert im Tierexperiment zwar bei kontinuierlicher Zufuhr die Sekretionsrate, verändert aber zugleich auch die Pankreasdurchblutung, so daß die Insulinkonzentration in abströmendem Blut sich kaum verändert (LEFEBVRE und LUYCKX, 1973). PGE_2 führt ebenfalls bei kontinuierlicher Zufuhr selbst hoher Dosen, die mit einem Blutdruckabfall und erheblichen Magen-Darm-Kontraktionen einhergehen, beim Menschen nicht zu einer Veränderung der Insulinkonzentration im Serum (LOSERT, LOGE und GUTSCHE, 1974). Es ist daher auch unwahrscheinlich, daß der ß-cytotrope Effekt von Sulfonylharnstoffen in irgend einer Weise über Prostaglandine vermittelt wird.

Eine gleiche Schlußfolgerung ist auch für die sulfonylharnstoffbedingte Hemmung der Thrombocytenaggregation zu ziehen, wobei im Unterschied zu den Inseln zumindest Prostaglandine vom E-Typ an diesen Zellen eine physiologische Bedeutung haben dürften. PGE_1 hemmt bei exogenem Zusatz in niedrigen Konzentrationen (Grenzdosis: 2 ng/ml) die Thrombocytenaggregation; PGE_2 bewirkt im gleichen Konzentrationsbereich das Gegenteil. Die untere Schwellendosis liegt ebenfalls bei 2 ng/ml. $PGF_{2\alpha}$ hat die gleiche Wirkung wie PGE_2, allerdings erst in Konzentrationen, die um mehr als zwei Zehnerpotenzen höher liegen. Sowohl PGE_2 als auch $PGF_{2\alpha}$ wurde in Thrombocyten bzw. TRP nachgewiesen, wie aus den bereits zitierten Untersuchungen von SMITH, INGERMAN, KOCSIS und SILVER (1973), sowie SILVER, SMITH, INGERMAN und KOCSIS (1972) hervorgeht. Die bei den vorliegenden Untersuchungen und bei Experimenten an Humanthrombocyten (SMITH, INGERMAN, KOCSIS und SILVER, 1973; KOCSIS, HERNANDOVICH, SILVER, SMITH und INGERMAN, 1973) während der Blutplättchenaggregation gemessenen PGE_2-Konzentrationen (~1 - 2 ng/ml bzw. o,8 - 24 ng/ml) liegen in Größenordnungen, in der das Prostaglandin bei exogenem Zusatz aggregationsfördernd wirkt. Die bei den erwähnten Versuchen mit menschlichen Thrombocyten bestimmte $PGF_{2\alpha}$-Konzentration lag etwa halb so hoch wie der PGE_2-Gehalt und damit weit unterhalb der Schwelle, die aggregationsfördernd wirkt. Nach weiteren Ergebnissen der zitierten Studien werden PGE_2 (und $PGF_{2\alpha}$) erst unter dem Einfluß aggregationsauslösender Substanzen wie ADP, Thrombin, Collagen sowie (an Humanthrombocyten auch) Adrenalin synthetisiert und während der Aggregation bzw. Gerinnung abgegeben. Unter Basalbedingungen waren Prostaglandine dagegen mit üblichen Methoden (z.B. Bioassay) praktisch nicht nachweisbar; die Prostaglandin-Konzentrationen müssen also unter diesen Umständen sehr niedrig sein.

Ob und wodurch in Thrombocyten die Synthese (und Abgabe) von PGE_1 stimuliert und damit reguliert wird, ist nicht bekannt. Nach den erwähnten Experimenten mit menschlichen Thrombocyten haben die untersuchten aggregationsfördernden Substanzen keinen Einfluß auf die PGE_1-Bildung. Grundsätzlich sind Thrombocyten allerdings in der Lage, PGE_1 in gleicher Weise wie PGE_2 zu synthetisieren. Dies wurde bei in vitro-Versuchen anhand von Einbaustudien mit ^{14}C-Acetat nachgewiesen (^{14}C-Acetat $\rightarrow$ ^{14}C-Dihomo-γ-linolensäure $\rightarrow$ ^{14}C-PGE_1; ^{14}C-Acetat $\rightarrow$ ^{14}C-Arachidonsäure $\rightarrow$ ^{14}C-PGE_2) (CLAUSEN und SRIVASTAVA, 1972; SRIVASTAVA und CLAUSEN, 1972).

Unterschiede in der Steuerung der Biosynthese und Freisetzung von PGE_1 und PGE_2 sind auch aus anderen Geweben bekannt, z.B. aus dem Zentralnervensystem. Während ADP an Gehirnschnitten die Biosynthese von PGE_1 stimulierte, wurde die Bildung von PGE_2 durch cAMP gefördert (ABDULLA und MacFARLANE, 1972). Wahrscheinlich beruhen diese Differenzen zu einem wesentlichen Teil auf der unterschiedlichen Verteilung der Prostaglandinvorstufen in den jeweiligen Geweben. Die primären Prostaglandine, d.h. die E- und F-Prostaglandine, werden durch eine Prostaglandinsynthetase aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildet, die in veresterter Form in verschiedenen

Lipidfraktionen enthalten sind und durch entsprechende Lipasen (Esterasen) bereitgestellt werden (HORTON, 1972). Neben der Aktivität der Prostaglandin-Synthetase ist daher die freie Konzentration dieser Fettsäuren und damit letztlich ihre Freisetzung aus den jeweiligen Lipiden für die Prostaglandinbildung geschwindigkeitsbestimmend.

Die Vorstufe von PGE_2 (und $PGF_{2\alpha}$) ist die Arachidonsäure, eine C2o:4-Fettsäure (5 cis, 8 cis, 11 cis, 14 cis - Eicosatetraenoic acid); PGE_1 (und $PGF_{1\alpha}$) entstehen aus der Dihomo -γ- linolensäure, die nur drei Doppelbindungen aufweist (C2o:3,8 cis, 11 cis, 14 cis - Eicosatrienoic acid) (HORTON, 1972). Während die Arachidonsäure nach Analysen des Lipidspektrums verschiedener Gewebe (z.B. Fettgewebe, Serumlipide) sowohl in Cholesterinestern und Phospholipiden als auch in Triglyceriden vorkommt, ist die Dihomo -γ- linolensäure in nachweisbaren Mengen nur in den beiden zuerst genannten Lipidfraktionen, dagegen praktisch nicht in den Triglyceriden enthalten (KIRKEBY, 1972; van DORP, 1971). Da die Spaltung dieser verschiedenen Fettsäureester durch verschiedene Lipasen (Phospholipasen, Cholesterinesterasen, Triglyceridlipasen) erfolgt, deren Aktivität in unterschiedlicher Weise reguliert wird, ist damit auch eine voneinander unabhängige Steuerung der PGE_1- und PGE_2-Synthese möglich. Hinzu kommt, daß nach bisherigen Untersuchungen in den Lipiden, die überhaupt Dihomo-γ- linolensäure enthalten, deren Konzentration erheblich geringer ist als der Gehalt an Arachidonsäure (KIRKEBY, 1972; van DORP, 1971). Es wäre daher durchaus denkbar, daß in den Thrombocyten PGE_1 nur in einer sehr niedrigen, unter physiologischen Bedingungen mehr oder weniger nicht modifizierbaren Konzentration vorkommt, die im Basalzustand geringfügig über der (absolut ebenfalls niedrigen) PGE_2-Konzentration liegt und eine Aggregation der Zellen verhindert. Unter dem Einfluß aggregationsauslösender Substanzen würde bei dieser Annahme isoliert die PGE_2-Synthese stimuliert und damit durch eine drastische Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses von PGE_2 zu PGE_1 eine Aggregationsbereitschaft ermöglicht werden.

Bei der Frage nach einer möglichen Beteiligung von Prostaglandinen am aggregationshemmenden Effekt der Sulfonylharnstoffe müssen daher folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: Sulfonylharnstoffe könnten entweder die Synthese von PGE_2 hemmen oder die Wirkung dieses Prostaglandins behindern. Außerdem wäre eine - nach den zitierten Befunden allerdings weniger wahrscheinliche - isolierte Stimulation der PGE_1-Synthese oder eine Wirkungssteigerung des endogenen PGE_1 zu diskutieren.

Gegen eine Erhöhung der PGE_1-Bildung oder eine verbesserte PGE_1-Wirkung durch Sulfonylharnstoffe spricht der Befund, daß der Effekt von Sulfonylharnstoffen nicht wie die Aggregationshemmung nach Zusatz von exogenem PGE_1 durch Theophyllin potenziert wird.

Gegen eine Herabsetzung der PGE_2-Synthese sprechen die Ergebnisse, die bei der PGE_2-Bestimmung im Vergleich mit nichtsteroidalen Entzündungshemmstoffen (Indomethacin, Acetylsalicylsäure) erzielt wurden und in Übereinstimmung mit Ergebnissen an Humanthrombocyten stehen (KOCSIS, HERNANDOVICH, SILVER und INGERMAN, 1973). Es wurde bereits erwähnt, daß diese Antiphlogistica aus Untersuchungen an anderen Geweben als Hemmstoffe der Prostaglandinsynthetase bekannt sind. Sie führen auch in thrombocytenreichem Plasma zu einer Abnahme der PGE_2-Konzentration; dieser Effekt geht mit einer Hemmung der Thrombocytenaggregation einher. Die aggregationshemmende Wirkung der untersuchten Sulfonylharnstoffe (Tolbutamid, Glisoxepid, Glibenclamid) war dagegen nicht von einer Erniedrigung des PGE_2-Gehalts begleitet. Auch eine Beeinträchtigung der aggregationsfördernden Wirkung von endogenem PGE_2 durch Sulfonylharnstoffe ist unwahrscheinlich, da in diesem Fall der Effekt von Acetylsalicylsäure durch die oralen Antidiabetica potenziert werden müßte. Die Wirkungen beider Substanzklassen addierten sich jedoch nur zueinander.

4.1.2. Sulfonylharnstoffe und cAMP-Stoffwechsel in Thrombocyten und anderen Zellarten

Befunde über eine Beeinflussung der cAMP-Synthese oder des cAMP-Abbaus durch Sulfonylharnstoffe wurden von verschiedenen Autoren mitgeteilt und mit der ß-cytotropen Wirkung und extrapankreatischen Effekten der Substanzen in Verbindung gebracht. So führte Tolbutamid in vitro in Konzentrationen zwischen 10^{-7}M und 10^{-4}M zu einer Stimulation der Adenylatcyclase an Partikelpräparaten, die aus einem menschlichen Inselzelladenom sowie aus Herzgewebe des Menschen und des Kaninchens gewonnen wurden (LEVEY, PALMER, LASSETER and McCARTH 1971; LASSETER, LEVEY, PALMER and McCARTHY, 1972; LEVEY, SCHMIDT und MINTZ, 1972). Eine Steigerung der Adenylatcyclaseaktivität wurde auch unter dem Einfluß von Chlorpropamid, Acetohexamid und Tolazamid beobachtet (LASSETER, LEVEY, PALMER und McCARTHY, 1972). An einem Homogenat aus mikrodissezierten Inseln normaler und fettsüchtiger Mäuse wurde bei Zusatz von Glibenclamid ein gleichartiger Effekt gemessen (ATKINS und MATTY, 197o). Eine Hemmung der 3', 5'-AMP-Phosphodiesterase durch Sulfonylharnstoffe wurde bei in vitro Versuchen an Enzympräparationen verschiedener Gewebe beobachtet. Tolbutamid hatte in $5 \cdot 10^{-3}$M Konzentration eine etwa 5o%ige Hemmung der Phosphodiesterase im Gehirn sowie in der Niere, Leber und Lunge der Ratte, in einem Inselzelltumor des syrischen Goldhamsters isolierten Langerhansschen Inseln des Meerschweinchens und in menschlichen Thrombocyten zur Folge (BROOKER und FICHMAN, 1971; ROSEN, HIRSCH und GOREN, 1971; ROTH, PROUT, GOLDFINE, WOLFE, MUENZER, GRAUER und MARCUS, 1971; GOLDFINE, PERLMAN, MUENZER, 1971 SAMS und MONTAGUE, 1972). Durch hohe Tolbutamid- und Glibenclamidkonzentration wurde auch das cAMP abbauende Enzym im Fettgewebe der Ratte gehemmt (EBERT, HILLEBRANDT und SCHWABE, 1972), entsprechende Ergebnisse mit Chlorpropamid wurden an Nierengewebe und in Inselzelltumorgewebe des Hamsters gewonnen (BROOKER und FICHMAN, 1971; ROSEN, HIRSCH und GOREN, 1971).

Auf Grund einer Reihe weiterer Untersuchungen erscheint es zweifelhaft, daß diese an Zellfragmenten oder isolierten Enzymen erhobenen Befunde als hauptsächliche Erklärung der pankreatischen und extrapankreatischen Wirkungen von Sulfonylharnstoffen herangezogen werden können. So besteht zum Beispiel zwischen der ß-cytotropen Wirkung von Sulfonylharnstoffen und Substanzen wie Glucagon und Isoproterenol, die mit Sicherheit die cAMP-Synthese in vivo steigern, ein deutlicher Unterschied. Die Steigerung der Insulinsekretion durch Sulfonylharnstoffe wird im Gegensatz zur Wirkung der beiden anderen Substanzen durch Theophyllin weder potenziert, noch durch Imidazol reduziert oder durch Diazoxid aufgehoben; die Maximaleffekte beider Substanzklassen addieren sich zueinander (MALAISSE und MALAISSE-LAGAE, 1970; LOSERT, LOGE und JAHN, 1973, s. dort weit.Lit.). Wie bereits erwähnt wurde, verstärken sowohl Sulfonylharnstoffe als auch Glucagon und Isoproterenol bzw. Dibutyryl-cAMP die insulinfreisetzende Wirkung von Glucose. Sulfonylharnstoffe vermögen dabei jedoch den Effekt maximal wirksamer Glucosekonzentrationen nicht zu erhöhen, während die anderen Verbindungen dazu in der Lage sind (LOSERT, LOGE und JAHN, 1973; MALAISSE, 1972;MALAISSE, MAHY, BRISSON und MALAISSE-LAGAE, 1972; BRISSON, MALAISSE-LAGAE und MALAISSE, 1972; BRISSON und MALAISSE, 1971).

Nach heutigen Vorstellungen über den Mechanismus der Insulinsekretion erfolgt die Steuerung dieses Vorganges über die Höhe der intracellulären Konzentration an freiem Ca^{++}. Durch Ca^{++} wird ein an ein mikrofilamentär-mikrotubuläres System gebundener Vorgang ausgelöst, der zur Emiocytose des granulär gespeicherten Insulins führt (MALAISSE, 1972, s.dort weit.Lit.; BRISSON und MALAISSE, 1973). Neben der Verteilung von Ca^{++} zwischen dem intra- und extracellulären Raum hängt der Gehalt an freiem Ca^{++} im Cytosol von der Abgabe aus einer intracellulär gebundenen Form des Elektrotyten ab. Adenosin-3',5'-monophosphat steigert höchstwahrscheinlich die Ca^{++}-Freisetzung aus diesem intracellulären Speicherpool, während Glucose und Sulfonylharnstoffe über einen Angriff an der Zellmembran den Ausstrom von Ca^{++} in den Extracellulärraum hemmen (BRISSON, MALAISSE-LAGAE und MALAISSE, 1972; MALAISSE, 1973a; MALAISSE, PIPELEERS and MAHY, 1973; MALAISSE, 1973b; BRISSON und MALAISSE,1973). Da Sulfonylharnstoffe hierbei die Wirkung niedriger und mittlerer Glucosekonzentrationen steigern bzw. den Glucoseeffekt 'simulieren', die maximale glucoseabhängige Hemmung des Ca^{++}-Ausstromes aber nicht überschreiten, wäre ein Angriff am gleichen Receptorsystem zu diskutieren (MALAISSE, MAHY, BRISSON und MALAISSE-LAGAE, 1972; MALAISSE, MAHY und MALAISSE-LAGAE, 1971).

Die meisten Untersuchungen, die zu diesen Ergebnissen geführt haben, wurden mit Tolbutamid durchgeführt. Nach den bisher mitgeteilten Einzelheiten bestehen aber keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen verschiedenen Sulfonylharnstoffen. Eine Ausnahme bildet lediglich Glibenclamid, das sowohl in vitro (isolierte Inseln) (MALAISSE und MALAISSE-LAGAE, 1970; MALAISSE, MAHY, BRISSON und MALAISSE-LAGAE, 1972) als auch nach den vorliegenden Befunden in vivo die bereits durch maximal wirksame Glucosekonzentrationen stimulierte Insulinsekretion noch erhöht und damit eine theophyllin- bzw. cAMP-artige Wirkkomponente aufweist. Da Glibenclamid nicht wie Glucagon bei Zugabe zu isolierten Inseln die cAMP-Konzentration erhöht (TRAUTSCHOLD, DWENGER und SCHWEITZER, 1973; HINZ, GAGLIARDINO und PFEIFFER, 1973), ist eine Stimulation der Adenylatcyclase un-

wahrscheinlich. In Anbetracht der an isolierten Membranpartikeln beobachteten gleichartigen Steigerung der Cyclaseaktivität durch Glibenclamid und Tolbutamid wäre es auch schwer verständlich, wieso zwar Glibenclamid, nicht aber Tolbutamid diesen Effekt auch in vivo ausübt. Die fehlende Wirkung beider Sulfonylharnstoffe auf die cAMP-Synthese an intakten Zellen könnte dagegen mit den unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklärt werden, da die Antidiabetica das Adenylatcyclasesystem an Membranfragmenten nicht nur über die normalerweise an der Zelloberfläche gelegene regulatorische Untereinheit, sondern auch über die an der Innenseite lokalisierte katalytische Untereinheit oder dazwischen geschaltete Übertragung und Verstärkung des Signals (LOSERT, 1973, s.dort weit.Lit.) beeinflussen können.

Dagegen wäre es durchaus möglich, den gegenüber tolbutamidartigen Sulfonylharnstoffen stärkeren und länger anhaltenden ß-cytotropen Effekt von Glibenclamid durch eine zusätzliche Hemmung der intracellulär gelegenen 3', 5'-AMP-Phosphodiesterase zu erklären. Vergleichende in vitro-Untersuchungen an mikrodissezierten Inseln haben gezeigt, daß in einem albuminfreien Milieu, wie es im interstitiellen Flüssigkeitsraum herrscht, Glibenclamid von den Zellen aufgenommen wird (HELLMAN, SEHLIN und TÄLJEDAL, 1973; HOWELL und LACY, 1969), während Tolbutamid auf den Extracellularraum beschränkt bleibt (HELLMAN, SEHLIN und TÄLJEDAL, 1971) und seinen in vitro nachgewiesenen Hemmeffekt auf den cAMP-Abbau in vivo daher nicht ausüben kann. Für eine Aufnahme oder zumindest stärkere Haftung von Glibenclamid an den ß-Zellen sprechen auch bereits z.T. erwähnte Ergebnisse, die am isoliert perfundierten Pankreas der Ratte und in Humanversuchen beim Studium der Insulinsekretionskinetik unter dem Einfluß dieses Antidiabeticums erzielt wurden. Danach unterscheidet sich Glibenclamid z.B. vom Tolbutamid durch eine verzögert einsetzende, aber länger andauernde und damit stärkere Stimulation der Insulinsekretion, die in vitro auch dann noch nachweisbar war, wenn die Substanz aus dem Perfusionsmedium wieder entfernt wurde (SCHÖFFLING, HAUPT, KÖBERLICH und BEYER, 1973; FUSSGÄNGER, GOBERNA, HINZ, JAROS, KARSTEN, PFEIFFER und RAPTIS, 1969; GRODSKY, CURRY und BENNETT, 1969).

Die Tatsache, daß Glibenclamid bei den bereits zitierten Versuchen den cAMP-Gehalt isolierter Langerhansscher Inseln nicht erhöhte, spricht nicht gegen eine Beeinflussung des cAMP-Abbaus, da auch Theophyllin bei alleinigem Zusatz zum Inkubationsmedium die Konzentration des cyclischen Nukleotids nur geringfügig oder gar nicht steigerte. Erst in Kombination mit einem Cyclasestimulator (Glucagon) war ein drastischer Effekt erkennbar (TRAUTSCHOLD, DWENGER und SCHWEITZER, 1973). Entsprechende Kombinationsversuche mit Glucagon und Glibenclamid wurden bisher nicht durchgeführt.

Prinzipiell ähnliche Verhältnisse können nach den vorliegenden Ergebnissen und bisher publizierten Befunden auch für die Hemmung der Thrombocytenaggregation durch Sulfonylharnstoffe angenommen werden. Da cAMP die gleiche pharmakologische Wirkung besitzt, würde eine Stimulation der Adenylatcyclase oder Verminderung der Phosphodiesteraseaktivität den Sulfonylharnstoffeffekt erklären.

Die aggregationshemmende Wirkung von Tolbutamid und Glisoxepid wurde jedoch weder durch Theophyllin potenziert, noch verstärkten diese Verbindungen wie das Xanthinderivat den Hemmeffekt von PGE_1. Ein Einfluß auf die basale cAMP-Konzentration war ebenfalls nicht zu erkennen. Die Erhöhung des cAMP-Gehaltes nach Stimulation der Adenylatcyclase mit PGE_1 wurde durch Theophyllin, jedoch nicht durch Glisoxepid und nur mäßig durch Tolbutamid verstärkt. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde zwar abweichend von diesen Befunden über eine Zunahme der PGE_1-abhängigen Aggregationshemmung nach Zusatz von Tolbutamid berichtet; eindeutiger als bei den vorliegenden Untersuchungen konnte aber keine Potenzierung der cAMP-steigernden Wirkung des Prostaglandins beobachtet werden (ROTH, PROUT, GOLDFINE, WOLFE, MUENZER, GRAUER und MARCUS, 1971). Es ist daher unwahrscheinlich, daß cAMP in die Vermittlung der aggregationshemmenden Wirkung dieser Sulfonylharnstoffe eingeschaltet ist. Im Gegensatz dazu verhielt sich Glibenclamid wie Theophyllin, das Antidiabeticum potenzierte sowohl den PGE_1-Effekt auf die Thrombocytenaggregation als auch den cAMP-Gehalt der Zellen.

Da keine radioaktiv markierten Substanzen zur Verfügung standen, konnte nicht untersucht werden, ob diese Differenzen durch eine unterschiedliche Aufnahme in den Intracellulärraum der Thrombocyten bedingt sind, wie sie für Tolbutamid und Glibenclamid an den Inseln nachgewiesen wurde. Unabhängig davon läßt sich jedoch der Schluß ziehen, daß Sulfonylharnstoffe an den Thrombocyten wie an den ß-Zellen verschiedene Angriffspunkte besitzen. Da sich aus den Experimenten über Strukturwirkungsbeziehungen an Thrombocyten (Aggregationshemmung) und ß-Zellen (Blutclucosesenkung) Hinweise auf nicht grundsätzlich verschiedene 'Receptoren' ergeben haben, wäre es denkbar, daß Sulfonylharnstoffe auch an Thrombocyten primär mit der Zellmembran reagieren und dort z.B. über eine Permeabilitätsänderung einen für die Aggregation notwendigen Transportvorgang beeinflussen. Darüber hinaus sind die Verbindungen auch zu einer theophyllinartigen Beeinflussung des cAMP-Systems befähigt. An intakten Zellen scheint aber dieser Effekt nicht bei allen Substanzen eine Rolle zu spielen, möglicherweise aufgrund einer unterschiedlichen Anreicherung im Intracellulärraum.

Eindeutig wurde diese Wirkkomponente nur bei Glibenclamid nachgewiesen; andeutungsweise war sie außerdem bei dem Sulfonylaminopyrimidin-Derivat ZK 28 2oo erkennbar. Diese Substanz potenzierte zwar nicht so deutlich wie Glibenclamid die cAMP steigernde Wirkung von PGE_1, führte aber im Gegensatz zu Tolbutamid zumindest in einem Experiment zu einer gewissen Zunahme der PGE_1-abhängigen Aggregationshemmung. Es wurde bereits erwähnt, daß auch an den ß-Zellen Hinweise auf ähnliche Angriffspunkte beider Substanzen existieren. Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Verbindungen verstärkte ZK 28 2oo wie Glibenclamid die durch Glucose induzierte Insulinfreisetzung. Außerdem war bei tierexperimentellen und humanpharmakologischen Untersuchungen ein ähnlicher zeitlicher Ablauf

des blutglucosesenkenden und insulinfreisetzenden Effektes beider Antidiabetica erkennbar (langsam beginnende, lang anhaltende Wirkung) (LOSERT, 1974; LOSERT und BLUMENBACH, 1974). Eine eingehende Charakterisierung der Insulinsekretionskinetik von ZK 28 2oo ist dagegen am isoliert perfundierten Pankreas noch nicht erfolgt.

Untersuchungen über eine Beeinflussung des cAMP-Stoffwechsels durch Sulfonylharnstoffe in der Herzmuskulatur haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Sowohl Tolbutamid als auch Chlorpropamid, Tolazamid und Acetohexamid zeigten an verschiedenen isolierten Herzmuskelpräparaten eine signifikante, aber im Vergleich zu Noradrenalin nur sehr schwache positiv inotrope Wirkung, wie sie unter dem Einfluß von Verbindungen beobachtet wird, die den cAMP-Gehalt erhöhen (LEVEY, PALMER, LASSETER u. McCARTHY, 1971; LASSETER, LEVEY, PALMER und McCARTHY, 1972; ROTH, PROUT, GOLDFINE, WOLFE, MUENZER, GRAUER und MARCUS, 1971; GRASS III, SPANNEIMER, STONE und BROWN II, 1973). In einer sehr sorgfältig angelegten Studie wurde an spontan schlagenden Atrien und elektrisch gereizten Papillarmuskeln der Katze dagegen mit Glisoxepid in Konzentrationen, die bis o,2 mg/ml (o,44 mM) reichten und damit weit über dem therapeutischen Bereich lagen, keine Beeinflussung der Kontraktilität beobachtet (MANNESMANN, 1974; PULS, LOSERT, LOGE, SCHILLINGER, KEUP und KRONEBERG, 1974). In einer der mit Tolbutamid durchgeführten Studien wurde der Sulfonylharnstoffeffekt durch Theophyllin verstärkt (LASSETER, LEVEY, PALMER und McCARTHY, 1972; ROTH, PROUT, GOLDFINE, WOLFE, MUENZER, GRAUER und MARCUS, 1971). Dies wäre mit einer Stimulation der Adenylatcyclase vereinbar, wie sie in vitro an Membranpartikeln gemessen wurde. Allerdings war z.B. an einer Membranpräparation aus Herzmuskulatur der Katze keine Steigerung der cAMP-Synthese durch Tolbutamid nachzuweisen, während das Antidiabeticum auch bei dieser Tierart die Kontraktilität des Herzens geringfügig steigerte. Versuche mit menschlicher Herzmuskulatur ergaben dagegen entgegengesetzte Befunde. Hier war auch unter dem Einfluß von Tolbutamid kein positiv inotroper Effekt nachzuweisen, während die Adenylatcyclaseaktivität in vitro stimuliert wurde (ROTH, PROUT, GOLDFINE, WOLFE, MUENZER, GRAUER und MARCUS, 1971; Editorial, J.A.M.A., 1972; LASSETER, LEVEY, PALMER und McCARTHY, 1972). Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration wurde bisher mit keiner der geprüften Substanzen nachgewiesen. Gegen eine Hemmung der Phosphodiesterase, die ebenfalls in vitro bei Zusatz von Tolbutamid beobachtet wurde, spricht der Befund, daß die Substanz im Gegensatz zu Theophyllin nicht den positiv inotropen Effekt von Noradrenalin potenzierte (ROTH, PROUT, GOLDFINE, WOLFE, MUENZER, GRAUER und MARCUS, 1971). Eine Beeinflussung des cAMP-Stoffwechsels in vivo und eine kontraktilitätssteigernde Wirkung von Sulfonylharnstoffen muß daher überhaupt als fraglich angesehen werden.

Im Fettgewebe spielt cAMP bei der Steuerung des Gleichgewichtes zwischen Lipolyse und Lipogenese eine wichtige Rolle. Bei Zunahme der cAMP-Konzentration wird über eine Aktivierung der Triglyceridlipase in vermehrtem Maße Fett mobilisiert; bei Abnahme des cAMP-Gehaltes überwiegt die Triglyceridsynthese (Übersicht bei LOSERT, 1973, s.dort weit.Lit.). Sowohl im gelben als auch im braunen Fettgewebe äußert sich die an einem isolierten Enzym nachgewiesene Phosphodiesterasehemmung durch Sulfonylharnstoffe in einer Erhöhung der cAMP-Konzentration der Zellen. Sie wurde bei Zusatz von Tolbutamid als Verstärkung des Effektes von Noradrenalin oder Isoproterenol gemessen (FAIN, ROSENTHAL und WARD, 1972; BROWN, STEELE, STONE und STEELE, 1972; EBERT, HILLEBRANDT und SCHWABE, 1972). Glibenclamid, das ebenfalls die Phosphodiesteraseaktivität

reduzierte, hatte dagegen keine weitere Zunahme der durch Isopropylnoradrenalin erhöhten cAMP-Konzentration zur Folge (EBERT, HILLEBRANDT und SCHWABE, 1972). Sowohl Tolbutamid, als auch Glibenclamid und Glibornurid hemmten (trotz der zum Teil parallel gemessenen Zunahme des cAMP-Gehaltes) die durch Noradrenalin, Isoprenalin, Theophyllin oder Dibutyryl-cAMP stimulierte Triglyceridspaltung (EBERT, HILLEBRANDT und SCHWABE, 1972; BROWN, STEELE, STONE und STEELE, 1972; FAIN, ROSENTHAL und WARD, 1972; ROSAK, SCHÖFFLING, BARTELT, BEYER und SCHÖFFLING, 1972; ROSAK, BARTELT, HAUPT, BEYER und SCHÖFFLING, 1972). Bei einem dieser Experimente nahm bei einer Dosissteigerung von Glibenclamid der antilipolytische Effekt ab und ging in eine lipolytische Wirkung über. Auch andere Sulfonylharnstoffe und Sulfonylaminopyrimidine (Glisoxepid, Glidanil-Natrium) haben eine biphasische Wirkung. Sie steigern in hohen Konzentrationen die Basislipolyse und hemmen in etwas niedrigeren Konzentrationen die durch Adrenalin stimulierte Triglyceridspaltung (SCHILLINGER, LOGE und LOSERT, 1974; SCHILLINGER, 1972).

Für den antilipolytischen Effekt ist einerseits eine Hemmung der cAMP-abhängigen Proteinkinase und damit eine Herabsetzung der cAMP-Wirkung verantwortlich (WRAY und HARRIS, 1973). Zum anderen könnte er auf einer Veränderung der Aufnahme und der Verteilung von Ca^{++} beruhen, wie aus Untersuchungen mit verschiedenen Ca^{++}-Konzentrationen hervorgeht (EBERT, HILLEBRANDT und SCHWABE, 1972). Sollte es sich hierbei um einen Membraneffekt handeln, könnte auch an diesen Zellen wie an den Thrombocyten und Inseln ein cAMP-abhängiger und unabhängiger Angriffspunkt der Sulfonylharnstoffe angenommen werden. Die charakteristischen Unterschiede zwischen Glibenclamid und Tolbutamid, wie sie an diesen Zellarten beobachtet wurden, scheinen dagegen an Fettzellen nicht zu existieren.
Die Niere ist ein weiteres Organ, dessen Funktion durch Sulfonylharnstoffe beeinflußt wird. Seit längerer Zeit ist bekannt, daß Chlorpropamid zur Behandlung eines Diabetes insipidus centralis herangezogen werden kann (ARDUINO, FERRAZ und RODRIGUES, 1966; MEINDERS, TOUBER und de VRIES, 1967). Bei dieser Erkrankung ist infolge eines Vasopressinmangels die Wasserpermeabilität der Sammelrohre herabgesetzt. Die hormonabhängige Steigerung der Durchlässigkeit wird durch cAMP vermittelt (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971; s.dort weit.Lit.). Bei klinischen (MILLER und MOSES, 1970 a)und tierexperimentellen Studien an Ratten mit einem erblichen zentralen Diabetes insipidus (BERNDT, MILLER, KETTYLE und VALTIN, 197o; MILLER und MOSES, 1970 b)sowie in vitro - Experimenten an der Harnblase von Bufo marinus (INGELFINGER und MAYS, 1969; MENDOZA, 1969) - Vasopressin übt hier gleichartige Effekte wie an der Warmblüterniere aus - zeigte sich, daß der Chlorpropamideffekt an die Anwesenheit von ADH gebunden ist und auf einer Verstärkung der Wirkung geringer Vasopressinkonzentrationen beruht. Gegen eine Verminderung des cAMP-Abbaus, die aufgrund der in vitro festgestellten Phosphodiesterasehemmung vermutet werden könnte, spricht die Tatsache, daß auch der

Effekt von Theophyllin potenziert wurde. Eine Verstärkung des hormonalen „Einflusses auf die Adenylatcyclase, also möglicherweise ein Membraneffekt, ist danach als Ursache der Chlorpropamidwirkung zu diskutieren. Für eine unmittelbare Beeinflussung des cAMP-Stoffwechsels in vivo besteht dagegen vorläufig kein Anhalt. Außer dieser Substanz wurde bisher kein anderer Sulfonylharnstoff untersucht, der eine ähnlich starke antidiabetische Wirksamkeit besitzt. Sowohl Tolbutamid und Glymidin-Natrium als auch Glibenclamid hatten entweder nur eine unsichere Verminderung der Wasserausscheidung zur Folge (WIGGER, STEGEMANN, SCHELER und CREUTZFELDT, 1969) oder bewirkten sogar das Gegenteil (RADÓ und BORBÉLY, 1972).

Die Interpretation der in der Leber erhobenen Befunde bereitet Schwierigkeiten, da mit den verwendeten Referenzsubstanzen (Theophyllin, Imidazol und Insulin) nicht die aus in vitro-Versuchen bekannten oder aufgrund ihres Angriffspunktes erwarteten Veränderungen der cAMP-Konzentration beobachtet wurden. Auf mögliche Erklärungen dieser Befunde wird unter 4.2. eingegangen. Soweit die Sulfonylharnstoffe betroffen sind, wurde bereits darauf hingewiesen, daß ihre Stoffwechselwirkungen schwer mit einer 3',5'-AMP Phosphodiesterasehemmung vereinbar wären, da sie den durch Glucagon hervorgerufenen Veränderungen entgegengesetzt sind. Insofern steht die Tatsache, daß die untersuchten Substanzen den nach Injektion von Glucagon erhöhten cAMP-Gehalt der Leber nicht weiter steigerten und die basale cAMP-Konzentration sogar etwas erniedrigten, nicht im Widerspruch zu ihren Stoffwechseleffekten. Anders als in den ß-Zellen kann die in vivo nicht erkennbare Hemmung des cAMP-Abbaus kaum auf eine unterschiedliche oder fehlende Aufnahme der Verbindung in den intracellulären Raum zurückgeführt werden. Tolbutamid wird in der Leber metabolisiert; Glisoxepid wurde bei Untersuchungen mit radioaktiv markierter Substanz in der Leber nachgewiesen, die Verbindung wird außerdem zum Teil mit der Galle ausgeschieden (KOLB, SCHULZE und SPECK, 1974). Das gleiche gilt für Glibenclamid und ZK 28 2oo. Diese beiden Antidiabetica werden sogar zu einem erheblichen Teil durch die Leber über die Galle eliminiert (KELLNER, CHRIST, RUPP und HEPTNER, 1969; SPECK, 1973). Auch bei einer intracellulären Anreicherung dürften jedoch von den neueren Substanzen mit hoher relativer Wirksamkeit (Glisoxepid, Glibenclamid und ZK 28 2oo) infolge ihrer geringen Dosierung keine genügend hohen Wirkstoffkonzentrationen erzielt werden, die für eine Hemmung der Phosphodiesterase ausreichen.

Für Tolbutamid gilt diese Einschränkung dagegen nicht ohne weiteres. Nach i.v. Injektion von 5o mg/kg ist initial im extracellulären Raum durchaus vorübergehend mit einem etwa 10^{-3}M Wirkstoffgehalt zu rechnen. Auch ohne eine besonders hohe intracelluläre Anreicherung könnten daher zeitweilig die für eine cAMP-Abbauhemmung notwendigen Tolbutamid-Konzentrationen erzielt werden. Wenn trotzdem der cAMP-Gehalt nicht ansteigt, ist zu diskutieren, daß sich in vivo ein derartiger Hemmeffekt

entweder in einem begrenzten Zellkompartiment abspielt, dessen cAMP-Gehalt nur unwesentlich an der Gesamtkonzentration des cyclischen Nucleotids beteiligt ist, oder durch einen anderen Angriffspunkt der Sulfonylharnstoffe mit entgegengesetzter Auswirkung auf die cAMP-Konzentration überlagert wird. Mit der zuletzt genannten Möglichkeit wäre der Befund vereinbar, daß bei alleiniger Injektion der Sulfonylharnstoffe die cAMP-Konzentration gegenüber den Kontrollen sogar geringfügig abnahm. Da die stimulierende Wirkung von Glucagon nicht gleichfalls reduziert wurde, könnte sich ein derartiger Effekt der Sulfonylharnstoffe entweder nur auf einen kleineren, nicht der hormonalen Beeinflussung unterliegenden Pool auswirken, oder er wäre ohne weiteres durch das α-Zellhormon zu überwinden. Auf jeden Fall läßt sich hieraus schließen, daß die glucagonantagonistischen Stoffwechselwirkungen der Sulfonamidantidiabetica nicht über das cAMP-System vermittelt werden.

Gegen einen derartigen primären Zusammenhang spricht unter anderem auch die Tatsache, daß Sulfonylharnstoffe die Gluconeogenese aus Pyruvat und Fructose hemmen (HASSELBLATT, PANTEN und POSER, 1969; POSER, SCHÖNBORN, von KRIEGSTEIN und HASSELBLATT, 1971), während lediglich bei der Glucoseneubildung aus Pyruvat cAMP-abhängige Stoffwechselschritte eine Rolle spielen (EXTON und PARK, 1968; WILLIAMSON, BROWNING, THURMAN und SCHOLZ, 1969; JOHNSON, DAS, BUTCHER und FAIN, 1972). Ein Hinweis auf einen primären Angriffspunkt dieser Substanzen könnte vielleicht aus der in vitro beobachteten Einschränkung der O_2-Aufnahme und Abnahme der ATP-Konzentration unter dem Einfluß von Glibenclamid bzw. Tolbutamid abgeleitet werden (POSER, SCHÖNBORN, von KRIEGSTEIN und HASSELBLATT, 1971; de BEER und de SCHEPPER, 1967). Bei einer Reduktion des ATP/ADP-Quotienten ist unter anderem mit einer Verminderung ATP-abhängiger Phosphorylierungen zu rechnen, wie sie sowohl bei der Gluconeogenese aus Fructose und Pyruvat, als auch bei der Lipolyse eine Rolle spielen. Abgesehen davon, könnte sich eine Abnahme des ATP-Gehaltes in verschiedenen Kompartimenten über einen Substratmangel in einer Verminderung der cAMP-Konzentration äußern. Worauf die Beeinflussung des Energiestoffwechsels im einzelnen beruht, ob es sich um eine intracelluläre Wirkung oder einen Membraneffekt der Sulfonylharnstoffe handelt, ist bisher unbekannt.

4.2. Steuerung der Thrombocytenaggregation durch cAMP und Prostaglandine

Die durchgeführten Untersuchungen haben eine grundsätzliche Bestätigung des Zusammenhanges zwischen cAMP und Thrombocytenaggregation erbracht, wonach ein cAMP-Anstieg mit einer Hemmung, ein cAMP-Abfall mit einer Steigerung der Thrombocytenaggregation einhergeht. Eine Reihe von Befunden, insbesondere mit Substanzen, die als Modulatoren des cAMP-Abbaus bekannt sind, lassen sich aber andererseits schwer nach den bisherigen Vorstellung in dieses System einordnen. Außerdem gelten für die Thrombocyten

zum Teil im Gegensatz, zum Teil aber auch in Übereinstimmung mit anderen Zellsystemen einige Besonderheiten in der Steuerung des Adenylatcyclase-cAMP-Systems. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Beziehungen zwischen den Prostaglandinen sowie zwischen aggregationsauslösenden Substanzen (ADP, Thrombin) und dem cAMP-System.

4.2.1. Spezifische hormonale und pharmakologische Beeinflussung des thrombocytären Cyclasesystems

Aus den bei der Aggregationsmessung und cAMP-Bestimmung erzielten Ergebnissen ist abzuleiten, daß die Adenylatcyclase der Thrombocyten durch PGE_1, die ß-adrenerge Wirkkomponente der Catecholamine und Adenosin bzw. Adenosinderivate stimuliert wird, während der α-adrenerge Effekt von Adrenalin (und Noradrenalin) zu einer Abnahme des cAMP-Gehaltes der Zellen führen dürfte. Die mit Catecholaminen erhobenen Befunde stehen in Übereinstimmung mit Ergebnissen an anderen Geweben (z.B. den ß-Zellen der Inseln und zur Änderung der Wasserpermeabilität befähigter epithelialer Zellen), an denen ebenfalls antagonistische Effekte einer α- und ß-Receptorenstimulation beobachtet wurden (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971).

Mit Adenosin und Adenosinderivaten wurden dagegen in verschiedenen Geweben z.T. unterschiedliche Effekte auf die cAMP-Synthese oder -Konzentration beobachtet. So geht die antilipolytische Wirkung von Phenylisoprophyladenosin in Rattenfettzellen mit einer Abnahme der cAMP-Konzentration einher (WESTERMANN, 1971). Dieser Effekt wird durch eine Interferenz mit der Bindung von ATP an der Cyclase erklärt (WESTERMANN, 1971). Eine Hemmung der Adenylatcyclase durch Adenosin wurde an particulären Fraktionen verschiedener Gewebe gemessen (Gehirn, Nierenrinde und Leber der Ratte, Ehrlich-Ascitestumorzellen) (McKENZIE und BÄR, 1973). Im Gegensatz dazu haben SCHULTZ und DALY (1973) an Gehirnrindenschnitten eine Steigerung der cAMP-Bildung unter dem Einfluß von Adenosin beobachtet. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Diskrepanzen um eine Frage der Dosierung, die auch an Thrombocyten eine Rolle zu spielen scheint. Nach Angaben von HASLAM und LYNHAM (1972) wurde die Adenylatcyclase menschlicher Blutplättchen durch Adenosin in $2{,}5 \cdot 10^{-5}$M Konzentrationen stimuliert, während oberhalb von 10^{-4}M eine Hemmung der cAMP-Synthese auftrat.

Die Steigerung der cAMP-Synthese der Thrombocyten durch Prostaglandin E_1 entspricht der gleichartigen Wirkung dieser Verbindung an vielen anderen Geweben bzw. Zellen (Ovar, Thymus, Gehirnrinde, Leber, Lunge, Samenblase, Prostata, Niere, Hoden, Herz, Uterus, Milz, Schilddrüse, Adenohypophyse, Nierenrinde, Skelettmuskulatur) (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971). Lediglich an weißen Fettzellen wird die cAMP-Akkumulation durch das Prostaglandin vermindert. Dieser Effekt geht mit einer Hemmung der durch Noradrenalin stimulierten Lipolyse einher und wird durch einen ähnlichen Mechanismus wie die Wirkung von Adenosinderivaten erklärt (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971; KUEHL, 1973; WESTERMANN, 1971, WESTERMANN und STOCK, 1970).

Glucagon steigert die Adenylatcyclaseaktivität der Leber, des Fettgewebes, der ß-Zellen des Inselorgans und der Herzmuskulatur. Keine derartige Wirkung wurde dagegen in der Skelettmuskulatur beobachtet (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971). Nach den vorliegenden Ergebnissen stellen auch die Thrombocyten kein 'Zielorgan' dieses Hormons dar. Das gleiche gilt für Insulin, dessen Stoffwechselwirkungen in der Leber, im Fettgewebe sowie in der Herz- und Skelettmuskulatur zumindest z.T. über eine Erniedrigung der cAMP-Konzentration und/oder Hemmung der cAMP-Wirkung (Abnahme der cAMP-abhängigen Proteinkinaseaktivität) erklärt wird (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971; s. dort weit. Lit.; VILLAR-PALASI, LARNER und SHEN, 1971).

4.2.2. Wirkungsweise von Theophyllin, Imidazol und Insulin

Im Gegensatz zu den Effekten von PGE_1 und Isoprenalin besteht zwischen den eindeutigen pharmakologischen Wirkungen von Theophyllin und Imidazol (Aggregationshemmung oder -steigerung) und der Beeinflussung des cAMP-Systems eine Diskrepanz. Beide Substanzen verstärkten oder verminderten zwar mehr oder weniger deutlich die cAMP-steigernde Wirkung von PGE_1, eine Veränderung der basalen Konzentration des cyclischen Nucleotids war aber nicht nachweisbar. Auch die fehlende Beeinflussung des basalen oder durch Glucagon erhöhten cAMP-Gehaltes der Leber, die nach Injektion von Theophyllin, Imidazol oder Insulin festgestellt wurde, entsprach nicht den Erwartungen. Als Ursache dieser Diskrepanzen müssen mehrere Möglichkeiten diskutiert werden.

4.2.2.1. Für die Aggregation könnte ein bestimmter cAMP-Pool in einem kleineren Kompartiment von Bedeutung sein, dessen Änderungen sich nicht in meßbaren Veränderungen im Gesamt-cAMP-Gehalt der Zellen äußern. Verschiedene Phosphodiesterasen mit unterschiedlichen k_M-Werten und differierender zellulärer Lokalisation wurden z.B. im mehreren Geweben, unter anderem Thrombocyten, beschrieben (AMER und MARQUIS, 1972, s.dort auch weit. Lit.). Ebenfalls wie in anderen Zellen besteht auch in den Blutplättchen ein Gleichgewicht zwischen einer löslichen Form (Phosphodiesterase I) mit hohem k_M-Wert für cAMP ($1o^{-4}$M), die mehr als 95 % der Gesamtaktivität umfaßt, und einer wahrscheinlich an die Membran gebundenen Phosphodiesterase (Phosphodiesterase II) mit niedrigem k_M-Wert ($1o^{-6}$M) für das cyclische Nucleotid. Diese Phosphodiesterase II soll für den cAMP-Abbau in einem membrannahen cAMP-Pool von Bedeutung sein, der die Aggregationsfähigkeit der Zellen reguliert. Verschiebungen des Gleichgewichts zwischen beiden Formen sind möglich. So wurde von den genannten Autoren z.B. der cAMP-senkende Effekt von Adrenalin (α-adrenerge Wirkkomponente) unter anderem durch eine Zunahme der particulären Phosphodiesterase II auf Kosten der löslichen Phosphodiesterase I zurückgeführt. Es wäre denkbar, daß Substanzen wie Imidazol und Theophyllin ebenfalls dieses Gleichgewicht verschieben oder daß sie beide Enzyme in unterschiedlichem Maße beeinflussen und damit lediglich den angenommenen membrannahen cAMP-Pool variieren.

4.2.2.2. Es existieren außerdem Hinweise darauf, daß zumindest Phosphodiesterase-Hemmstoffe mehrere Angriffspunkte besitzen. Eingehendere Untersuchungen zu dieser Frage wurden allerdings nicht in der Leber und an Thrombocyten, sondern vorwiegend an Fettzellen durchgeführt. Hier führen an gereinigten Enzymen sehr wirksame Phosphodiesterase-Hemmstoffe wie Papaverin und Dipyridamol nicht zu einer Lipolysesteigerung bzw. cAMP-Erhöhung (BERNDT, EBERT und SCHWABE, 1971; SCHWABE und EBERT, 1972). Papaverin verhindert sogar eine Stimulation der cAMP-Synthese durch lipolytisch wirkende Hormone, setzt also auch die Adenylatcyclaseaktivität herab (BEAVO, ROGERS, CROFFORD, BAIRD, HARDMAN, SUTHERLAND und NEWMAN, 1971). Für Theophyllin wurde an einer Partikelfraktion aus Nierengewebe der Ratte ein ähnlicher Hemmeffekt auf die Cyclase beschrieben (JAKOBS und SCHULTZ, 197o), allerdings lag die hierzu erforderlich Konzentration sehr hoch (2o mM). Über entsprechende Untersuchungen am Fettgewebe ist nichts bekannt. Für Papaverin und Dipyridamol wurde außerdem ein hemmender Effekt auf die durch Dibutyryl-cAMP stimulierte Lipase beschrieben, der mit einer Abnahme der Lipaseaktivität in Fettgewebshomogenaten einherging. Daraus wurde auf eine Hemmung der cAMP-Wirkung durch diese Substanzen geschlossen (BERNDT, EBERT und SCHWABE, 1971). Aus weiteren Versuchen am Fettgewebe ergeben sich im übrigen Hinweise darauf, daß auch der potenzierende Effekt von Theophyllin auf die durch Hormone stimulierte cAMP-Akkumulation nicht immer auftritt, sondern von den Versuchsbedingungen abhängt (SCHWABE und EBERT, 1972). Als Ursache wird diskutiert, daß hierfür nicht in erster Linie die Phosphodiesterasehemmung verantwortlich ist, sondern Theophyllin die Synthese und/oder Abgabe eines Cyclasehemmstoffes (Hormonantagonisten) hemmt. Unter Berücksichtigung weiterer Ergebnisse der gleichen Autoren könnte es sich bei diesem Inhibitor um Adenosin handeln (EBERT, 1973; SCHWABE, 1973). Theophyllin verursacht aber am Fettgewebe auch dann deutliche Stoffwechselwirkungen (Lipolysesteigerung), wenn der cAMP-Gehalt kaum gesteigert ist (SCHWABE und EBERT, 1972). Außer der bereits diskutierten Aufteilung des cAMP-Gehaltes auf mehrere Kompartimente mit unterschiedlicher Beeinflussung durch Theophyllin könnte hierfür ein zusätzlicher Angriff der Substanz am lipolytischen System verantwortlich sein, z.B. eine Verstärkung der cAMP-Wirkung oder ein cAMP-artiger Eigeneffekt an der nachfolgenden Proteinkinase. Es erscheint daher nicht ausgeschlossen, daß auch Imidazol verschiedene Angriffspunkte im Zellstoffwechsel besitzt. Bei Richtigkeit dieser Annahmen wären damit aber sowohl Theophyllin als auch Imidazol nur in beschränktem Maße geeignet, Aufschlüsse über die Wirkart anderer Substanzen am cAMP-System zu geben.

4.2.2.3. Die fehlende cAMP-Abnahme nach Imidazol wäre durchaus mit einem gesteigerten cAMP-Abbau vereinbar, wenn hierbei unter anderem ein Abbauprodukt mit sehr ähnlicher Struktur wie cAMP und antagonistischer Wirkung auftritt, das bei der cAMP-Bestimmung mit dem Radioreceptorassay (Verwendung der natürlichen cAMP-Receptoren) miterfaßt wird und einen unveränderten Gehalt an cyclischem Nucleotid vortäuscht, oder wenn dessen Bildung keine wesentliche Abnahme der cAMP-Konzentration bedingt. Ein derartiger Mechanismus wird unter anderem für den Angriffspunkt von Insulin diskutiert (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971).

Das Hormon führt zwar nach Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen sowohl zu einer Hemmung der cAMP-Synthese als auch zu einer Zunahme der Phosphodiesteraseaktivität verschiedener Gewebe (Übersichten bei ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971; LOSERT, 1973, s. dort jeweils weit. Lit.). Unter dem Einfluß hoher Insulinkonzentrationen (3,6 mE/ml) wurde auch in vitro in der (isoliert perfundierten) Leber sowie im Fettgewebe bzw. in Fettzellen eine Abnahme der cAMP-Konzentration gemessen (EXTON, LEWIS, HO, ROBISON und HO, 1971; ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971).
Im Skelettmuskel, in dem Insulin ebenfalls cAMP-antagonistische Stoffwechseleffekte ausübt, wurde dagegen bisher unter keiner Bedingung eine Erniedrigung des 3',5'-AMP-Gehaltes (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971), wohl aber eine Aktivitätsabnahme der durch cAMP stimulierten Proteinkinase, also eine Verminderung der cAMP-Wirkung beobachtet (VILLAR-PALASI, LARNER und SHEN, 1971). Dieser Befund wäre bei der Synthese eines cAMP-Analogons mit entgegengesetzter Wirkung zu erwarten. Auch die vorliegenden Ergebnisse, die mit niedrigen, aber wirksamen Insulindosen in vivo an der Leber erzielt wurden, deuten in diese Richtung. Danach wäre es denkbar, daß die durch Insulin gesteigerte Bildung einer derartigen Substanz nicht unter physiologischen, sondern nur unter unphysiologisch hohen Dosen zu einer nachweisbaren Abnahme des Gesamt-cAMP-reaktiven Materials führt oder daß erst durch derartig überhöhte Insulinkonzentrationen in vivo die Adenylatcyclase gehemmt bzw. die cAMP-Spaltung gefördert wird.

4.2.3. Stellung der Prostaglandine im Steuerungssystem der Thrombocyten

Daß Prostaglandine mit einiger Wahrscheinlichkeit für die pharmakologische Regulation der Thrombocytenfunktion von Bedeutung sind, wurde bereits in anderem Zusammenhang erwähnt. Enge Beziehungen zwischen diesen Substanzen und dem cAMP-System sind ebenfalls unbestritten. Dies betrifft sowohl die Synthese und Abgabe von Prostaglandinen als auch ihre Wirkungen (SHIO, SHAW und RAMWELL, 1971). Die Bildung bzw. Freisetzung von Prostaglandinen und anderen granulär gespeicherten Substanzen aus Thrombocyten wird durch aggregationsauslösende Substanzen wie Thrombin, ADP, Collagen und (an Humanplättchen) α-adrenerge Catecholamine stimuliert (SMITH, INGERMAN, KOCSIS und SILVER; 1973, BORN, 1972). Alle diese Verbindungen sind in der Lage, die cAMP-Konzentration zu erniedrigen (SALZMAN, 1972, s.dort auch weit.Lit.). Ob cAMP die PG-Synthese in Thrombocyten hemmt, ist unbekannt. Befunde, die an anderen Geweben erhoben wurden (Rattenfettgewebe, Froschhaut, Magenschleimhaut der Ratte) deuten aber darauf hin, daß cAMP die PG-Synthese steigert, da mit lipolytisch wirkenden, als Stimulatoren der Cyclase bekannten Substanzen eine erhöhte PG-Bildung hervorgerufen wurde (SHIO, SHAW und RAMWELL, 1971). Diese Möglichkeit wäre auch insofern plausibel, als bei einer Zunahme der Lipidspaltung in erhöhtem Maße mehrfach ungesättigte Fettsäuren und damit Vorstufen für die PG-Synthese zur Verfügung gestellt werden. Mit Dibutyryl-cAMP selbst gelang es allerdings nur in der Magenmucosa der Ratte, die PG-Synthese anzuregen (SHAW und RAMWELL, 1968).

Eindeutiger sind dagegen die Beziehungen zwischen der pharmakologischen Wirkung von Prostaglandinen und dem cAMP-System. PGE_1 hemmt in niedrigen Konzentrationen die Thrombocytenaggregation, steigert die cAMP-Konzentration und stimuliert an Plasmamembranen enthaltenden Präparationen (Thrombocytenlysate) die cAMP-Synthese (ZIEVE und GREENOUGH III, 1969; SALZMAN und LEVINE, 1971). Sowohl der aggregationshemmende Effekt als auch die Erhöhung des cAMP-Gehaltes werden durch Theophyllin potenziert; die PGE_1-bedingte Hemmung der Thrombocytenaggregation kann durch Dibutyryl-cAMP imitiert werden. Damit sind mehrere Kriterien erfüllt, die für eine Vermittlung eines pharmakologischen Effektes durch cAMP zu fordern sind (ROBISON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1971).

Unklar ist nur, ob das Prostaglandin über einen gleichartigen Receptor an der Zelloberfläche wirkt wie andere als Cyclasestimulatoren bekannte Hormone (z.B. Catecholamine, Glucagon) oder ob PGE_1 das Enzym durch die Entfernung von Ca^{++} aus einem in der Membran lokalisierten, mit der Cyclase verbundenen Ca^{++}-Pool stimuliert. Ca^{++} hemmt bei exogenem Zusatz die durch PGE_1 erhöhte cAMP-Synthese an isolierten Plasmamembranen (VIGDAHL, MARQUIS und TAVORMINA, 1969), nicht aber bei Zusatz zu intakten Zellen (SHIO und RAMWELL, 1972). Unabhängig davon wurde noch ein zusätzlicher cAMP-unabhängiger Angriffspunkt im Regulationssystem der Thrombocyten diskutiert. In einer der publizierten Untersuchungen hemmte PGE_1 nämlich die Thrombocytenaggregation bereits in Konzentrationen, die noch nicht zu meßbaren Steigerungen der cAMP-Synthese führten. Zwischen den jeweiligen Dosiswirkungskurven war ein deutlicher Abstand festzustellen(AMER und MARQUIS, 1972). Auch im zeitlichen Ablauf wurden Unterschiede zwischen Steigerung der cAMP-Synthese und Aggregationshemmung durch PGE_1 beobachtet (BALL, BRERETON, FULWOOD, IRELAND und YATES, 1970). Andere Autoren haben dagegen eine gute Übereinstimmung zwischen Aggregationshemmung und Zunahme der cAMP-Konzentration nach Zusatz von PGE_1 gemessen (VIGDAHL, MARQUIS und TAVORMINA, 1969; SHIO, SHAW und RAMWELL, 1971). Auch die vorliegenden Ergebnisse sprechen gegen eine cAMP-unabhängige Wirkkomponente des Prostaglandins, da auch der aggregationshemmende Effekt minimal wirksamer, unmittelbar oberhalb der Schwellendosis liegender PGE_1-Konzentrationen durch Theophyllin potenziert wurde. Die beobachteten Diskrepanzen zwischen pharmakologischer Wirkung und aktueller cAMP-Konzentration könnten auf der bereits in anderem Zusammenhang diskutierten Möglichkeit beruhen, daß sich primär Änderungen in einem membrannahen cAMP-Pool abspielen, die sich nicht in einer Zunahme des größeren Gesamtgehaltes äußern.

Auch zwischen PGE_2 und dem Adenylatcyclase-cAMP-System bestehen mit Sicherheit enge Beziehungen. Im gleichen Konzentrationsbereich, in dem PGE_1 die cAMP-Synthese fördert und die Thrombocytenaggregation hemmt, bewirkt PGE_2 das Gegenteil. Von verschiedenen Autoren wurde nicht nur eine Aufhebung des cAMP-steigernden Effektes von PGE_1 durch PGE_2 gemessen (SHIO, RAMWELL und JESSUP, 1972), sondern auch eine Erniedrigung der basalen cAMP-Konzentration und eine Aktivitätsabnahme der thrombocytären Adenylatcyclase (SALZMAN, 1972).

Wie bei den vorliegenden Ergebnissen zeigte dabei PGE_2 in höheren Konzentrationen einen PGE_1-artigen, cAMP-steigernden Effekt. Nach diesen Befunden könnten beide Prostaglandine lokale Modulatoren der cAMP-Synthese sein, wobei PGE_2 möglicherweise wie ein kompetitiver Antagonist mit schwacher agonistischer Wirkung endogenes PGE_1 von seinem Receptor an der Cyclase verdrängt und erst bei sehr hoher Konzentration eine schwache PGE_1-artige Stimulation des Enzyms hervorruft. Die Aktivität des Enzyms würde damit von dem Verhältnis zwischen PGE_1 und PGE_2 gesteuert werden.

Im Gegensatz zu PGE_1 muß aber ein ausschließlicher Angriff von PGE_2 an der Adenylatcyclase bezweifelt werden, vor allem als Ursache der aggregationsfördernden Wirkung dieses Prostaglandins. Nach den vorliegenden Ergebnissen war zwar bei Zusatz der maximal aggregationsfördernden Dosis von o,2 µg/ml PGE_2 eine signifikante Abnahme des cAMP-Gehaltes festzustellen. Die Verminderung der Konzentration an endogenem PGE_2, die unter dem Einfluß des Prostaglandinsynthetasehemmstoffes Äcetylsalicylsäure gemessen wurde und von einer Hemmung der Aggregation begleitet war, ging jedoch nicht mit einer Reduktion des cAMP-Gehaltes einher. Auch ADP, das nach bereits mehrfach erwähnten Untersuchungen an Humanthrombocyten die Synthese und Feisetzung von PGE_2 fördert, führte bei den vorliegenden Experimenten nicht zu einer meßbaren Abnahme der cAMP-Konzentration. Entsprechend der für PGE_1 diskutierten Möglichkeit könnten auch in diesem Fall Änderungen in einem membrannahen cAMP-Pool erfolgt sein ohne daß der Gesamtgehalt der Zellen nachweisbar abgenommen hat. Aufgrund weiterer Befunde erscheint es jedoch wahrscheinlicher, daß die aggregationsfördernde Wirkung physiologischer Konzentrationen von PGE_2 primär auf einem vom Adenylatcyclasesystem unabhängigen Effekt beruht, der sich synergistisch mit einer PGE_1-antagonistischen Wirkung an der Cyclase und daraus resultierender Abnahme des cAMP-Gehaltes auswirkt.

Es konnte nämlich gezeigt werden, daß PGE_1 und PGE_2 zwar die durch ADP induzierte Thrombocytenaggregation in entgegengesetzter Weise beeinflussen, jedoch nicht die der Aggregation vorausgehende Änderung der Zellform, die ebenfalls durch ADP hervorgerufen wird und wahrscheinlich eine Voraussetzung für die gegenseitige Haftfähigkeit der Thrombocyten darstellt (SHIO und RAMWELL, 1972). Die normalerweise flachen Thrombocyten nehmen hierbei eine Kugelform an. Während PGE_1 diesen Vorgang hemmt, wird er durch PGE_2 in aggregationsfördernden Konzentrationen nicht gesteigert, sondern eher ebenfalls geringfügig reduziert, vor allem bei steigender Dosis. Bei einer Kombination beider Prostaglandine ist der Nettohemmeffekt geringer als bei alleinigem Zusatz von PGE_1, aber größer als unter dem Einfluß der gleichen PGE_2-Konzentration (SHIO, RAMWELL und JESSUP, 1972). Dieser Befund stellt einerseits eine Bestätigung für den gemeinsamen Angriff beider Prostaglandine am Cyclasesystem dar und stützt die Theorie eines kompetitiven Antagonismus bei

unterschiedlicher 'intrinsic activity'. Zugleich zeigt er jedoch, daß eine Modulation der PGE_1-abhängigen cAMP-Synthese allein nicht die Aggregationssteigerung durch PGE_2 erklären kann, sondern daß dieses Prostaglandin eine zusätzliche unmittelbare Wirkung auf den Aggregationsvorgang selbst ausüben muß. cAMP greift dagegen auf einer vorangehenden Stufe in die Reaktionskette ein, indem es die für die Aggregation notwendige Gestaltänderung der Thrombocyten verhindert.

Es wurde bereits erwähnt, daß $PGF_{2\alpha}$ zwar ebenfalls in Thrombocyten gebildet wird, aber die dabei auftretenden Konzentrationen die Aggregation der Blutplättchen nicht beeinflussen. Eine physiologische Bedeutung dieses Prostaglandins für die Thrombocytenfunktion erscheint daher fraglich. Möglicherweise hat das von den Blutplättchen abgegebene $PGF_{2\alpha}$ eine Funktion bei Folgereaktionen in der Umgebung (Gefäßeffekte, Blutgerinnung). Unklar bleibt auch die physiologische Bedeutung des Guanylatcyclase-cGMP-Systems, dessen Existenz in Thrombocyten nachgewiesen wurde. Nach Untersuchungen an anderen Geweben kann die cGMP-Synthese durch $PGF_{2\alpha}$ und Acetylcholin unter bestimmten Bedingungen stimuliert werden (KUEHL, 1972, 1973; GEORGE, POLSON, O'TOOLE und GOLDBERG, 1970); in den Thrombocyten wurde ein derartiger Effekt für Acetylcholin aufgezeigt (JUNG, MECHLER, MOCIKAT und BOEHME, 1972). Wie Acetylcholin (und $PGF_{2\alpha}$) beeinflußt auch cGMP nicht die Thrombocytenaggregation.

4. Wirkungsweise von aggregationsauslösenden Substanzen

Im Gegensatz zu PGE_2, das die Thrombocytenaggregation nur verstärkt, sind Substanzen wie ADP, Collagen, Thrombin, Serotonin und (an Humanthrombocyten) Catecholamine mit vorwiegend α-adrenerger Wirksamkeit in der Lage, diesen Vorgang auch auszulösen (SALZMAN, 1972; BORN, 1972; MUSTARD und PACKHAM, 1970). Zwischen diesen Verbindungen und dem cAMP-System sowie den Prostaglandinen bestehen ebenfalls enge Beziehungen. Es wurde bereits erwähnt, daß ADP, Collagen, Thrombin und Adrenalin die Synthese und Abgabe von PGE_2 (und $PGF_{2\alpha}$) stimulieren (SALZMAN, 1972; SMITH, INGERMAN, KOCSIS und SILVER, 1973). Nach den bisherigen Ausführungen kann hierdurch ihr spezifischer Effekt aber nicht erklärt werden. Das gleiche gilt für die Abnahme der intracellulären cAMP-Konzentration, die durch diese Verbindungen verursacht wird (SALZMAN, 1972). Für Thrombin, Adrenalin bzw. Noradrenalin wurde sowohl an Zellfragmenten als auch an intakten Thrombocyten eine Hemmung der Adenylatcyclase nachgewiesen (SALZMAN und LEVINE, 1971; BRODIE, BAENZIGER, CHASE und MAJERUS, 1972; HARWOOD, MOSKOWITZ und KRISHNA, 1971). Entsprechende Befunde an particulären Fraktionen existieren für Serotonin und Collagen (SALZMAN und LEVINE, 1971); die beiden Catecholamine sollen nach anderen Ergebnissen auch über α-Receptoren den cAMP-Abbau fördern (AMER, 1971; AMER und MARQUIS, 1972). ADP hemmte an intakten Zellen die durch PGE_1 stimulierte cAMP-Synthese und verminderte bei einigen Untersuchungen auch geringfügig die basale cAMP-Konzentration der Zellen (HASLAM, 1973; SALZMAN und NERI, 1969; SALZMAN, 1972).
Bei den vorliegenden Experimenten wurde keine nachweisbare Abnahme des Gehalts an cyclischem Nucleotid registriert.

Im Gegensatz zu den übrigen aggregationsauslösenden Verbindungen scheint es sich bei dieser gelegentlich beobachteten cAMP-senkenden Wirkung von ADP um einen indirekten Effekt zu handeln, da die Cyclaseaktivität isolierter Enzympräparationen nicht herabgesetzt wurde (SALZMAN und LEVINE, 1971). Unabhängig von inrem Zustandekommen konnte gezeigt werden, daß eine cAMP-Abnahme nicht automatisch zur Aggregation von Thrombocyten führt, da in der Gegenwart niedriger PGE_1-Konzentrationen und normalem oder sogar leicht erhöhtem cAMP-Gehalt durchaus eine Aggregation stattfinden kann (HASLAM, 1973).

Intensivere Untersuchungen, die mit ADP durchgeführt wurden, lassen einen doppelten Angriffspunkt aggregationsauslösender Verbindungen wahrscheinlich erscheinen. Danach kann man annehmen, daß sie über einen intracellulären, Ca^{++}-abhängigen Mechanismus, der auch durch cAMP reguliert wird, die für die Aggregationsbereitschaft notwendige Änderung der Zellgestalt beeinflussen und außerdem über einen vom extracellulären Ca^{++}-Gehalt abhängigen Mechanismus zu einer Oberflächenveränderung führen, die die Haftung der Thrombocyten aneinander bewirkt. Parallel damit wird die Abgabe von aggregationsfördernden Prostaglandinen und ein Sekretionsprozeß stimuliert, bei dem aus intracellulären Speicherorganellen ADP, Adrenalin, Serotonin und Plättchenfaktoren sowie Ca^{++} freigesetzt werden. Durch eine Art Kettenreaktion wird dadurch die Thrombocytenaggregation weiter ausgebreitet, eine Gefäßreaktion ausgelöst und die Blutgerinnung eingeleitet, wobei das entstehende Thrombin erneut den Aggregationsmechanismus verstärkt. Insgesamt stellt diese Reaktionskette eine sinnvolle Integration der an der Blutstillung beteiligten Vorgänge dar (BORN, 1972; MUSTARD und PACKHAM, 197o; SALZMAN, 1972; SHIO und RAMWELL, 1972; s.dort auch jeweils weitere Lit.).

Über den Mechanismus des eigentlichen Aggregationsvorganges ist noch wenig bekannt. Man weiß allerdings aus Experimenten mit ADP, daß er durch EDTA verhindert werden kann (SHIO und RAMWELL, 1972). Im Gegensatz dazu ist die ebenfalls durch ADP ausgelöste Umwandlung der normalerweise flachen Thrombocyten in kugelige Zellen nicht vom extracellulären Ca^{++}-Gehalt abhängig; sie wird durch EDTA nicht unterdrückt (SHIO, PLASSE und RAMWELL, 197o; BORN, 197o). Über eine Abhängigkeit der Freisetzung von Hormonen und Adeninnucleotiden von der Ca^{++}-Konzentration der Umgebung liegen widersprüchliche Befunde vor, der Sekretionsprozeß wird aber wie die Gestaltsänderung durch Dibutyryl-cAMP bzw. eine Erhöhung des cAMP-Gehalts (PGE_1) verhindert (MUSTARD und PACKHAM, 197o; BOUSSER, 1973; SALZMAN, 1973, s. dort weit. Lit.). Beide Vorgänge unterliegen also möglicherweise den gleichen intracellulären Regulationsvorgängen.

Hierbei sind deutliche Parallelen zu anderen sekretorisch tätigen Zellen (z.B. den ß-Zellen) und den glatten Muskelfasern erkennbar. Die der Aggregation vorangehende Gestaltsänderung der Thrombocyten könnte danach durch ein actomyosinartiges kontraktiles Protein, Trombosthenin, bewirkt werden (BETTEX-GALLAND, 1972; SHIO und RAMWELL, 1972; MUSTARD und PACKHAM, 197o).

Wie in der glatten und quergestreiften Muskulatur wird die Kontraktion durch Ca^{++} ausgelöst (BETTEX-GALLAND, 1972), dessen freie Konzentration damit die Zellform und die Aggregationsbereitschaft steuert. Thrombocyten besitzen ein mikrotubuläres System, das dem Ca^{++}-bindenden sarkoplasmatischen Reticulum der Muskulatur ähnelt (SHIO und RAMWELL, 1972); aus Thrombocyten wurde außerdem ein relaxierender Faktor dargestellt, der Ca^{++} bindet (GRETTE, 1963; STATLAND, HEAGAN und WHITE, 1964). Damit existiert wie in Muskelzellen ein System, durch das die intracelluläre Ca^{++}-Verteilung zwischen einem freien und gebundenen Pool reguliert werden kann.

Es wäre denkbar, daß cAMP wie in der glatten Muskulatur die Aufnahme von Ca^{++} in die intracellulären Speicher fördert (BETTEX-GALLAND, 1972), damit die Kontraktion des Thrombosthenins und letztlich die Aggregation der Thrombocyten verhindert. Andererseits konnte gezeigt werden, daß ADP die Ca^{++}-Aufnahme durch den relaxierenden Faktor behindert (STATLAND, HEAGAN und WHITE, 1969) und auf diese Weise zu einer Erhöhung des cellulären Gehalts an ionisierten Ca^{++} führen kann. Da Ca^{++} intracellulär die Adenylatcyclase hemmt, wäre hierdurch auch die unter dem Einfluß von ADP beobachtete Abnahme der cAMP-Konzentration zu erklären. Durch diesen Effekt bzw. eine direkte Hemmung der cAMP-Synthese durch die übrigen aggregationsauslösenden Substanzen käme es zu einer weiteren Nettoabgabe von Ca^{++} aus dem Speicherpool und damit einer zusätzlichen Verstärkung der Thrombosthenkontraktion.

Es ist spekuliert worden, daß - abgesehen von ihrem Hemmeffekt auf die Cyclase - auch andere aggregationsauslösende Verbindungen ihren primären Effekt nicht selbst ausüben, sondern ihre Wirkungen ebenfalls durch ADP vermittelt werden, z.B. indem sie zunächst eine schnelle Synthese von ADP aus ATP in der Zellmembran bewirken (BORN, 1972; MUSTARD und PACKHAM, 1970). So konnte z.B. die nach Zusatz von Serotonin auftretende Gestaltsänderung der Thrombocyten durch einen spezifischen ADP-Antagonisten verlangsamt werden (BORN, 1972). Über die initiale Stoffwechselreaktion, die durch ADP ausgelöst wird, existieren bisher nur Vermutungen. Sicher ist nur, daß das Nucleotid nicht von den Zellen aufgenommen wird, sondern über einen Receptor an der Oberfläche wirkt. Die durch ADP ausgelöste Gestaltsänderung der Thrombocyten beginnt mit einer Abnahme des ATP/ADP-Quotienten in der äußeren Membran (BORN, 1972). Man nimmt an, daß diese Verschiebung direkt durch das exogene ADP verursacht wird oder daß in der Gegenwart von exogenem ADP durch eine Nucleotid-Diphosphokinase die Dephosphorylierung von endogenem ATP zu ADP in der Membran beschleunigt wird (BORN, 1972; SALZMAN, 1972). Da hierbei unter anderem die Verfügbarkeit energiereicher Phosphate für Speicherfunktionen abnimmt, wurde spekuliert, daß in Analogie zur Muskulatur die Abnahme des ATP/ADP-Quotienten zu einer Freisetzung von Ca^{++} aus den intracellulären Ca^{++}-Speichern führt, die in der Membran selbst oder in dem mit ihr verbundenen mikrotubulären System angenommen werden (BORN, 1972).

Während PGE_1 über eine cAMP-Steigerung den Gestaltswechsel der Thrombocyten verhindert und damit die Aggregation hemmt, PGE_2 wahrscheinlich primär den von der extracellulären Ca^{++}-Konzentration abhängigen und durch ADP ausgelösten Aggregationsvorgang verstärkt und nichtsteroidale Entzündungshemmer wie Indomethacin und Acetylsalicylsäure diesen Vorgang durch Einschränkung der PGE_2-Biosynthese behindern, ist zur Zeit noch ungeklärt, welche Phase der Aggregation durch die vom cAMP-System unabhängige Wirkkomponente der Sulfonylharnstoffe gehemmt wird. Es ist lediglich bekannt, daß auch die Freisetzung granulär gespeicherter Substanzen unterdrückt wird, wie am Beispiel der durch Thrombin hervorgerufenen Ca^{++}-Abgabe festgestellt wurde (ROTH, PROUT, GOLDFINE, WOLFE, MUENZER, GRAUER und MARCUS, 1971). Durch weitere Untersuchungen wird zu klären sein, ob die Antidiabetica bereits wie PGE_1 bzw. cAMP die der Aggregation vorausgehende Formänderung der Thrombocyten verhindern oder primär den vom Ca^{++}-Gehalt der Umgebung abhängigen eigentlichen Aggregationsvorgang unterdrücken.

4.3. Therapeutische Bedeutung des Sulfonylharnstoffeffekts

Da der Diabetes mellitus mit einer gesteigerten Aggregationsbereitschaft der Thrombocyten einhergeht, die zusammen mit der diabetischen Angiopathie ein erhöhtes Thromboserisiko darstellen könnte, ist in der aggregationshemmenden Wirkung der Sulfonylharnstoffe eine wünschenswerte therapeutische Eigenschaft zu sehen. Setzt man voraus, daß die in vitro ermittelten Hemmkonzentrationen auch in vivo wirksam sind, dürfte allerdings in der Praxis kein therapeutischer Effekt mit allen zur Zeit verwendeten oralen Antidiabetica zu erzielen sein. Vor allem ist es unwahrscheinlich, daß nach oraler Einnahme der in den letzten Jahren entwickelten Sulfonylharnstoffe und Sulfonylaminopyrimidine, die in Einzeldosen unterhalb von 100 mg die Blutglucose erniedrigen, beim Menschen eine zur Aggregationshemmung ausreichende Wirkstoffkonzentration im Serum auftritt. Jedoch auch mit den älteren Substanzen, deren Dosen im Bereich von 0,5 bis 1,5 g liegen, dürften keine Konzentrationen erreicht werden, die in vivo die Thrombocytenaggregation wirksam herabsetzen. So wurden zum Beispiel nach oraler Applikation von 5 mg Glibenclamid maximale Serumkonzentrationen von 0,2 µg/ml ($\sim 0{,}4 \cdot 10^{-6}$M) gemessen. Bei den gleichen Personen stieg nach Gabe von 1 g Tolbutamid der Wirkstoffgehalt im Serum auf 45 µg/ml ($\sim 0{,}2 \cdot 10^{-3}$M) an (RAPTIS, NADJAFI, von BERGER, SCHMID, HRSTKA, ROTHENBUCHNER und PFEIFFER, 1973). Nach Einnahme von 2 g Tolbutamid wurden von einer anderen Arbeitsgruppe maximale Serumkonzentrationen von 180 µg/ml ($\sim 0{,}7 \cdot 10^{-3}$M) beobachtet (HALLER und STRAUZENBERG, 1966, s. dort weit. Lit.).

In keinem Fall wurden also Konzentrationen über 10^{-3}M erreicht, wie sie in vitro für eine wirksame Aggregationshemmung notwendig waren. Wenn damit beim Menschen ein zusätzlicher therapeutischer Effekt nicht zu erwarten ist, ist zumindest eine gegengesetzte Wirkung der Sulfonylharnstoffe und damit ein hierauf beruhendes zusätzliches Thromboserisiko unwahrscheinlich.

Da zwischen der blutglucosesenkenden und aggregationshemmenden Wirksamkeit keine feste Korrelation besteht, erscheint es nicht ausgeschlossen, Verbindungen zu finden, die beim Menschen in annehmbarer Dosierung beide Effekte im gleichen Maße ausüben.

5. Zusammenfassung

5.1. Aus Literaturhinweisen ist bekannt, daß beim Diabetes mellitus die Aggregationsbereitschaft der Blutplättchen erhöht ist. Neben den im Verlaufe dieser Krankheit auftretenden Gefäßwandläsionen stellt diese Tatsache ein zusätzliches Risiko für die Entstehung von Thrombosen dar. In einer Hemmung der Thrombocytenaggregation, wie sie in vitro vor kurzem unter dem Einfluß ß-cytotroper Sulfonylharnstoffe (Tolbutamid, Gliclazid) beobachtet wurde, wäre daher eine zusätzliche, erwünschte Wirkungsqualität dieser Pharmaka zu sehen.

5.2. Hiervon ausgehend wurde untersucht, ob eine Hemmung der Thrombocytenaggregation als grundsätzliche Eigenschaft aller ß-cytotropen Antidiabetica anzusehen ist und ob eine Dissoziation zwischen dieser Eigenschaft und dem blutglucosesenkenden Effekt besteht. Außerdem wurde geprüft, ob sich ein Anhalt für gleiche oder ähnliche Angriffspunkte von Sulfonylharnstoffen am Steuerungssystem der Thrombocyten, ß-Zellen und der Leber ergeben. Hierbei interessierte vor allem, ob Sulfonylharnstoffderivate ihre Wirkungen über das Adenylatcyclase-cAMP-System ausüben. An den Thrombocyten wurde außerdem untersucht, ob ß-cytotrope Antidiabetica wie nichtsteroidale Entzündungshemmstoffe die Synthese aggregationsfördernder Prostaglandine (PGE_2) hemmen.

5.3. Die Beeinflussung der durch Adenosindiphosphat (ADP) induzierten Thrombocytenaggregation wurde in vitro mit thrombocytenreichem Rattenplasma (TRP) nach einer turbidimetrischen Methode studiert. Die Konzentrationen von PGE_2 wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen mit einem radioimmunologischen Verfahren gemessen. Sowohl in Thrombocyten (TRP, in vitro) als auch in der Leber und im Serum (in vivo) wurde der cAMP-Gehalt mit einem Proteinbindungstest (Radioreceptorassay) bestimmt. Hierzu wurde das natürliche cAMP-Receptorprotein aus Rindernebennieren verwendet.

Die Beurteilung der ß-cytotropen Wirksamkeit erfolgte in vivo an Ratten durch Bestimmung der Glucosekonzentration im Blut nach i.v. Injektion der Sulfonylharnstoffderivate. Als Maß für die Insulinsekretion diente die Insulinkonzentration im Serum des Pfortaderblutes von Ratten. Die Glucosebestimmung erfolgte enzymatisch mit Glucoseoxidase und Peroxidase; Insulin wurde radioimmunologisch nach einem Doppelantikörperverfahren gemessen.

5.4. Für die vergleichende Beurteilung der aggregationshemmenden und ß-cytotropen Wirkung wurden zehn Sulfonylharnstoffderivate ausgewählt. Von ihnen war eine unterschiedliche relative blutzuckersenkende Wirksamkeit und zum Teil auch ein differierender zeitlicher Ablauf in der Stimulation der Insulinsekretion bekannt. Alle Verbindungen führten zu einer dosisabhängigen Blutglucosesenkung und Hemmung der ADP-abhängigen Thrombocytenaggregation. Zwischen beiden Effekten zeigte sich eine deutliche Dissoziation. Während sich die äquieffektiven blutglucosesenkenden Dosen der Verbindungen um maximal vier Zehnerpotenzen unterschieden, lagen die zur Aggregationshemmung in vitro erforderlichen äquieffektiven Konzentrationen maximal nur um das vier- bis fünffache auseinander. Eine Zunahme der ß-cytotropen Potenz geht danach nicht mit einer Steigerung der aggregationshemmenden Wirksamkeit einher. Der für eine 5o %ige Hemmung der ADP-abhängigen Blutplättchenaggregation notwendige Wirkstoffgehalt betrug zwischen 1,8 mM (Glibenclamid) und 1o mM (Glymidin-Natrium).

Diese Konzentrationen liegen weit oberhalb des Bereiches, der in vivo im Plasma nach Gabe blutglucosesenkender Dosen von Sulfonylharnstoffderivaten erreicht werden kann. Das gilt nicht nur für Substanzen wie Glibenclamid, Glisoxepid, Gliclazid und Glidanil-Natrium, die in sehr geringer Dosierung die Blutglucose erniedrigen. Auch mit Tolazamid, Tolbutamid oder Glymidin-Natrium (Glykodiazin) ist bei oraler Einnahme therapeutischer Dosen selbst vorübergehend nicht mit einem 10^{-3}M Wirkstoffgehalt im Plasma zu rechnen.

Außer Sulfonylharnstoffderivaten hemmen auch Biguanide (Phenformin, 1-Butylbiguanid) in vitro die Thrombocytenaggregation. Die für diesen Effekt erforderlichen Konzentrationen lagen ebenfalls über 1 mM und damit oberhalb des therapeutischen Bereiches.

5.5. Trotz der großen Differenz zwischen den zur Steigerung der Insulinsekretion und Hemmung der Thrombocytenaggregation erforderlichen Dosen bzw. Konzentrationen bestehen offenbar zwischen den 'Rezeptoren' an beiden Zellsystemen keine grundsätzlichen Unterschiede. Von zwei stereoisomeren Sulfonylaminopyrimidinen mit sonst gleicher Struktur [(+) bzw. (-)-4-〈N-(5-Isobutyl-2-pyrimidinyl)-sulfamoyl〉-phenylessigsäure-1-(5-fluor-2-methoxyphenyl)-aethylamid] weist die L(-)-Form (ZK 28 2oo) sowohl an den ß-Zellen (Blutglucosesenkung) als auch an den Thrombocyten (Aggregationshemmung) eine höhere relative Wirksamkeit auf als die R(+)-Form (ZK 28 2o1).

5.6. Wie die ß-cytotrope Wirkung gleicht der aggregationshemmende Effekt von Sulfonylharnstoffderivaten der Wirkung von Hormonen und Pharmaka, die den intracellulären cAMP-Gehalt erhöhen. Sowohl Dibutyryl-cAMP als auch Stimulatoren der Adenylatcyclase (Prostaglandin E_1=PGE_1, Adenosin und Adenosinderivate, die ß-adrenerge Wirkkomponente der Catecholamine) und Inhibitoren der

cAMP-Phosphodiesterase (Theophyllin) hemmen dosisabhängig die Thrombocytenaggregation. Die als Phosphodiesteraseaktivatoren bekannten Verbindungen Imidazol und 5-Methyl-isoxazol-3-carbonsäure haben einen aggregationsfördernden Effekt. Das gleiche gilt für die α-adrenerge Wirkkomponente von Catecholaminen. Glucagon und Insulin, die an anderen Geweben antagonistische, durch cAMP vermittelte Effekte ausüben, beeinflussen nicht die Thrombocytenfunktion.

Eingehendere Untersuchungen wurden mit PGE_1, Theophyllin und Imidazol durchgeführt. Wie aufgrund des unterschiedlichen Angriffspunktes am cAMP-System zu erwarten ist, verstärkt Theophyllin die aggregationshemmende Wirkung des Prostaglandins und die durch PGE_1 hervorgerufene Steigerung der cAMP-Konzentration. Imidazol hat einen entgegengesetzten Effekt, der sich allerdings am cAMP-Gehalt nur schwach äußert. Sowohl Imidazol als auch Theophyllin beeinflussen nicht die basale cAMP-Konzentration der Thrombocyten.

5.7. An der aggregationshemmenden Wirkung der Sulfonylharnstoffe sind zwei verschiedene Vorgänge beteiligt. Neben einem von cAMP-System unabhängigen Angriffspunkt muß für einige Substanzen auch eine zusätzliche cAMP-Phosphodiesterasehemmung diskutiert werden. Bei zwei von vier näher charakterisierten Verbindungen (Glisoxepid, Tolbutamid, ZK 28 2oo, Glibenclamid) war diese Eigenschaft mehr oder weniger deutlich ausgeprägt. Während Glisoxepid und Tolbutamid nicht den aggregationshemmenden Effekt von PGE_1 überadditiv verstärkten, waren Glibenclamid und - in schwächerem Maße - ZK 28 2oo hierzu in der Lage. In gleicher Weise potenzierte Glibenclamid auch den cAMP-steigernden Effekt von PGE_1. Mit ZK 28 2oo und auch Tolbutamid wurde eine qualitativ gleichartige aber quantitativ geringere Steigerung der PGE_1-Wirkung erzielt; Glisoxepid zeigte keinen derartigen Effekt. Die basale cAMP-Konzentration wurde durch keine der vier Substanzen erhöht.

Eine Stimulation der thrombocytären Adenylatcyclase ist unwahrscheinlich, da die Hemmung der Thrombocytenaggregation durch Glisoxepid oder Glibenclamid bei Zusatz von Theophyllin nicht überadditiv verstärkt wurde. Der aggregationshemmende Effekt von Glisoxepid wurde auch nicht wie die Wirkung von Adrenalin durch α- oder ß-Receptorenblocker (Phentolamin bzw. Methylphenoxyisopropylaminopropanol) modifiziert.

5.8. Als Ursache des vom cAMP-System primär unabhängigen Angriffspunktes von Sulfonylharnstoffen an Thrombocyten konnte eine Hemmung der Synthese und Abgabe von Prostaglandin E_2 (PGE_2) ausgeschlossen werden. Während die aggregationshemmende Wirkung von Acetylsalicylsäure mit einer Abnahme der PGE_2-Konzentration im TRP einherging, wurde mit Glisoxepid und Glibenclamid keine derartige Veränderung beobachtet.

Im Gegensatz zu PGE_1 steigert PGE_2 in niedrigen Konzentrationen die durch ADP induzierte Blutplättchenaggregation. Die untere Grenzkonzentration (~ 2 ng/ml) liegt in einer Größenordnung, die während der Aggregation in TRP gemessen wurde. In höheren Konzentrationen (> 2oo ng/ml) nimmt dieser Effekt wieder ab und geht in eine Aggregationshemmung über. Auch $PGF_{2\alpha}$ wirkt aggregationssteigernd, allerdings erst in~ 25ofach höheren Konzentrationen als PGE_2. Diese Größenordnung liegt weit über dem physiologischen Bereich.

Unter dem Einfluß aggregationsfördernder Konzentrationen von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ wurde eine Abnahme des cAMP-Gehaltes der Thrombocyten gemessen. Bei Zusatz einer hohen PGE_2-Dosis, die einen hemmenden Effekt auf die Aggregation der Blutplättchen zeigte, nahm die cAMP-Konzentration wie unter dem Einfluß von PGE_1 zu. Der pharmakologische Effekt und die Veränderung des cAMP-Gehaltes verliefen jedoch nicht absolut parallel. Da außerdem trotz Abnahme der PGE_2-Konzentration im Ansatz die aggregationshemmende Wirkung von Acetylsalicylsäure nicht von einem cAMP-Anstieg begleitet war, kann der aggregationsfördernde Effekt von PGE_2 nicht ausschließlich durch eine verminderte cAMP-Synthese erklärt werden. Hiermit stimmen Befunde anderer Autoren überein, die wohl eine antagonistische Beeinflussung der Thrombocytenaggregation, aber nicht der vorausgehenden Gestaltänderung der Zellen durch PGE_1 und PGE_2 beobachtet haben (SHIO, RAMWELL und JESSUP, 1972).

5.9. Ein Hinweis auf verschiedene celluläre Angriffspunkte von Sulfonylharnstoffderivaten ergab sich auch an den ß-Zellen. Während Glisoxepid und Tolbutamid unter den gewählten Versuchsbedingungen die Stimulation der Insulinsekretion durch eine hohe Glucosedosis (2g/kg i.v.) nicht mehr weiter zu steigern vermochten, wurde mit Glibenclamid und ZK 28 2oo wie mit Theophyllin ein weiterer Anstieg des Seruminsulins im Pfortaderblut beobachtet. Da bekannt ist, daß durch Erhöhung der cAMP-Konzentration die Insulinsekretion auch bei hohem Glucosegehalt noch stimuliert werden kann, wäre dieser Befund mit einer Beeinträchtigung des cAMP-Abbaus in den ß-Zellen vereinbar. Über eine Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase durch Sulfonylharnstoffe in vitro wurde von verschiedenen Autoren berichtet. Eine unterschiedliche celluläre Aufnahme verschiedener Derivate dieser Substanzklasse (HELLMAN, SEHLIN und TÄLJEDAL, 1971, 1973) könnte in vivo dafür verantwortlich sein, daß nicht alle Verbindungen in gleicher Weise das cAMP-System beeinflussen. Der wahrscheinlich an der Zelloberfläche lokalisierte primäre Sulfonylharnstoff-'Receptor' ist dagegen für alle ß-cytotropen Antidiabetica zugänglich.

5.1o. In der Leber wurde in vivo nach i.v. Injektion äquihypoglykämisch wirksamer Dosen von Tolbutamid, Glisoxepid, Glibenclamid und ZK 28 2oo weder eine Steigerung der basalen noch der durch Glucagon erhöhten cAMP-Konzentration gemessen. Auch im Serum wurden keine relevanten Veränderungen des cAMP-Gehaltes beobachtet.

Die basale cAMP-Konzentration in der Leber nahm eher geringfügig ab. Da Sulfonylharnstoffe und Glucagon den Stoffwechsel der Leber in entgegengesetzter Weise beeinflussen, wäre eine Hemmung des cAMP-Abbaus auch schwer zu interpretieren. Die erhobenen Befunde schließen einen derartigen Mechanismus aber nicht aus, da auch durch Theophyllin der cAMP-steigernde Glucagoneffekt nicht eindeutig verstärkt wurde. Ebenso war mit dem Phosphodiesteraseaktivator Imidazol sowie mit Insulin in Dosen bis zu 5 IE/kg (i.v.) keine Abnahme der Glucagonwirkung zu erzielen, wie sie bei Experimenten an der isoliert perfundierten Leber von EXTON, LEWIS, HO, ROBISON und PARK (1971) mit hohen Konzentrationen des Hormons (3,6 mE/ml) beobachtet wurde. Diese Diskrepanzen könnten u.a. darauf beruhen, daß innerhalb der Zellen mehrere Kompartimente existieren, deren cAMP-Gehalt unabhängig voneinander reguliert wird, wobei Veränderungen in einem Pool nicht zu nachweisbaren Zu- oder Abnahmen der Gesamtkonzentration führen müssen.

6. Literaturverzeichnis

Abdulla, Y.H., and E. McFarlane:

Control of prostaglandin biosynthesis in rat brain homogenates by adenine nucleotides.

Biochem. Pharmacology, 21, 2841 (1972)

Adelsman, M.R., G.G. Borisy, M.L. Shelanski, R.C. Weisenberg, and E.W. Taylor:

Cytoplasmic filaments and microtubules.

Fed. Proc., 27, 1186 (1968)

Amer, M.S.:

Effects of epinephrine (EPI) and α-adrenergic agonists on adenosine -3',5'cyclic monophosphate (cAMP) phosphodiesterase (PDE) from rabbit tissue.

Fed. Proc., 30, 220 (1971)

Amer, M.S., and N.R. Marquis:

The effect of prostaglandins, epinephrine and aspirin on cyclic AMP phosphodiesterase activity of human blood platelets and their aggregation.

In: Prostaglandins in Cellular Biology, p. 93, edited by P.W. Ramwell and B.B. Pharriss, Plenum Press, New-York - London (1972)

Arduino, F., F.P.J. Ferraz, and J. Rodrigues:

Antidiuretic action of chlorpropamide in idiopathic diabetes insipidus.

J. Clin. Endocr., 26, 1325 (1966)

Atkins, T., and A.J. Matty:

Adenyl cyclase and cyclic AMP-phosphodiesterase activity in the isolated islets of Langerhans of normal and obese mice.

J. Endocr., 48, XIVII (1970)

Bänder, A.:

Zur Pharmakologie und Toxikologie der blutzuckersenkenden Sulfonamide.

In: Oral wirksame Antidiabetika, Herausgeber: A. Maske, Seite 317; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1971)

Ball, G., G.G. Brereton, M.Fulwood, D.M. Ireland, and P. Yates:

Effect of prostaglandin E_1 alone and in combination with theophylline or aspirin on collagen-induced platelet nucleotides including adenosine 3':5'-cyclic monophosphate.

Biochem. J., 120, 709 (1970)

Beavo, J.A., N.L. Rogers, O.B. Crofford, C.E. Baird, J.G. Harman, E.W. Sutherland, and E.V. Newman:

Effects of phosphodiesterase inhibitors on cyclic AMP levels and on lipolysis.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 185, 129 (1971)

de Beer, L., and P.J. de Schepper:

Metabolic effects of hypoglycemic sulfonylureas. II. In vitro effects of sulfonylureas on cell-free protein synthesis and energy metabolism in rat tissues.

Biochem. Pharmacol., 16, 2355 (1967)

Beregi, S., P. Hugon, P. Desnoyers, and J. Duhault:

Patent, Science-Union et Cie.

D.O.S. 2 231 174 vom 11.1.1973

Bergström, S. (Editor), and S. Bernhard (Associate Editor):

International Conference on Prostaglandins, Vienna, September 25 to 28, 1972.

Advances in the Biosciences, vol. 9., edited by G. Raspé and S. Bernhard, Pergamon Press-Vieweg, Oxford, Edinburgh, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig (1973)

Berndt, S., R. Ebert, and U. Schwabe:

Effects of 3',5'-AMP-phosphodiesterase inhibitors on adipose tissue lipolysis.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 270, (suppl.), R 10 (1971)

Berndt, W.O., M. Miller, W.M. Kettyle, and H. Valtin:

Potentation of the antidiuretic effect of vasopressin by chlorpropamide.

Endocrinology, 86, 1028 (1970)

Bettex-Galland, M. and E.F. Lüscher:

Thrombosthenin, the contractile protein from blood platelets and its relation to other contractile proteins.

Adv. Prot. Chem., 20, 1 (1965)

Born, G.V.R.:

Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.

Nature, (Lond.),194, 927 (1962)

Born, G.V.R.:

The uptake of adrenaline by human blood platelets.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path., 259, 155 (1968)

Born, G.V.R.:

Observation on the change in shape of blood platelets brought about by adenosine diphosphate.

J. Physiol. (Lond.), 209, 487 (1970)

Born, G.V.R.:

The functional physiology of blood platelets.

In: Platelet Function and Thrombosis, a Review, p. 3, edited by P.M. Mannucci and S. Gorini.
Plenum Press, New York - London (1972)

Born, G.V.R., and M.J. Cross:

The aggregation of blood platelets.

J. Physiology (Lond.), 168, 178 (1963)

Bousser, M.-G.:

Prostaglandin E_1 and platelets.

Biomedicine, 18, 95 (1973)

Brisson, G.R., F. Camu, F. Malaisse-Lagae, and W.J. Malaisse:

Effect of a local anesthetic upon calcium uptake and insulin secretion by isolated islets of Langerhans.

Life Sciences, 10, (part I), 445 (1971)

Brisson, G.R., and W.J. Malaisse:

Insulinotropic effect and possible mode of action of a new potent sulfonylurea (BS-4231).

Canad. J. Physiol. Pharmacol., 49, 536 (1971)

Brisson, G.R., and W.J. Malaisse:

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release.
XI. Effects of theophylline and epinephrine on ^{45}Ca efflux from perifused islets.

Metabolism, 22, 455 (1973)

Brisson, G.R., F. Malaisse-Lagae, and W.J. Malaisse:

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release.
VII. A proposed site of action for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate.

J. Clin. Invest., 51, 232 (1972)

Brodie, G.N., N.L. Baenziger, L.R. Chase, and Ph.W. Majerns:

The effects of thrombin on adenyl cyclase activity and a membrane protein from human platelets.

J. Clin. Invest., 51, 81 (1972)

Brooker, G., and M. Fichman:

Chlorpropamide and tolbutamide induced inhibition of adenosine-3',5' cyclic monophosphate phosphodiesterase.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 824 (1971)

Brown, B.L., J.D.M. Albano, R.P. Ekins, and A.M. Sgherzi:

A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate.

Biochem. J., 121, 561 (1972)

Brown, J.D., A.A. Steele, D.B. Stone, and F.A. Steele:

The effect of tolbutamide on lipolysis and cyclic AMP concentration in white fat cells.

Endocrinology, 90, 47 (1972)

Caen, J.P., C.S.P. Jenkins, H. Michel, and R. Bellanger:

Adenosine inhibition of human platelet aggregation by ADP.

Nature (Lond.), New Biology, 239, 211 (1972)

Cavalli-Storza, L.:

Biometrie, Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.

Kap.6, S. 80, 2. Auflage,
Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart (1969)

Clausen, J., and K.C. Srivastava:

The biosynthesis of prostaglandins in thrombocytes.

Biochem. J., 128, 4 P (1972)

Cordes, U., J. Beyer, G. Sell, E. Haupt und K. Schöffling:

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe. Der Einfluß von Glibornurid und Insulin auf den Blutzucker, die Plasma-Katubolamine und das immunologisch meßbare Insulin nach Blockade adrenerge Receptoren.

Arzneimittel-Forsch. (Drug-Res.), 22, 2164 (1972)

Crass III, M.F., R.G. Spanheimer, D.B. Stone, and K.J. Brown:

Tolbutamide-induced inotropic responses in the perfused working heart: effects of albumin.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 142, 861 (1973)

Desnoyers, P., J. Labaume, M. Anstett, M. Herrera, J. Pesquet, and J. Sebastien:

The pharmacology of S 1702, a new highly effective oral antidiabetic drug with unusual properties.
Part 3: Antistickiness activity, fibrinolytic properties and haemostatic parameters study.

Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.), 22, 1691 (1972)

van Dorp, D.:

Recent developments in the biosynthesis and the analysis of prostaglandins.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 180, 181 (1971)

Ebert, R.:

On the significance of adenosine in the regulation of cyclic AMP levels and lipolysis in isolated fat cells.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 277, (suppl.), R 13 (1973)

Ebert, R., O. Hillebrandt, and U. Schwabe:

Influence of tolbutamide and glibenclamide on lipolysis, phosphodiesterase and cyclic 3',5'-AMP level in isolated fat cells.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 274, (suppl.), R 31 (1972)

Editorial:

Tolbutamide and the heart.

J. Amer. Med. Ass., 222, 1179 (1972)

Exton, J.H., S.B. Lewis, R.J. Ho, G.A. Robison, and C.R. Park:

The role of cyclic AMP in the interaction of glucagon and insulin in the control of liver metabolism.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 185, 85 (1971)

Fain, J.N., J.W. Rosenthal, and W.F. Ward:

Anti-lipolytic action of tolbutamide on brown fat cells.

Endocrinology, 90, 52 (1972)

Faulhaber, J.-D., H. Ditschuneit und H.H. Ditschuneit:

Die Wirkung von Sulfonylharnstoffen - HB 419 (Glibenclamid), Tolbutamid und Tolazamid - auf die Lipolyse isolierter menschlicher Fettzellen.

Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.), 19, 1476 (1969)

Feldmann, J.M., and H.E. Lebovitz:

An insulin dependent effect of chronic tolbutamide administration on the skeletal muscle carbohydrate transport system.

Diabetes, 18, 84 (1969)

Fröhlich, J., and O. Wieland:

Different actions of glucagon and fatty acids on gluconeogenesis from lactate in the perfused rat liver.

Horm. Metab. Res., 4, 171 (1972)

Fußgänger, R.D., R. Goberna, M. Hinz, P. Jaros, C. Karsten, E.F. Pfeiffer, and S. Raptis:

Comparative studies on the dynamics of insulin secretion following HB 419 and tolbutamide of the perfused isolated rat pancreas and the perifused isolated pieces and islets of the rat.

Horm. Metab. Res., 1, (suppl.), 34 (1969)

Genuth, S., and H. Lebovitz:

Stimulation of insulin release by corticotropin.

Endocrinology, 76, 1093 (1965)

George, W.J., J.B. Polson, A.G. O'Toole, and N.D. Goldberg:

Elevation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine.

Proc. natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 66, 398 (1970)

Gerhards, E., B. Nieuweboer und H. Gutsche:

Über 2-Benzolsulfonylamino-5-(ß-methoxy-äthoxy)-pyrimidin (Glykodiazin).
VI. Versuche zum Wirkungsmechanismus des oralen Antidiabeticums Glykodiazin bei gesunden Versuchspersonen.

Arzneimittel-Forsch. (Drug-Res.), 18, 570 (1968)

Gilman, A.G.:

Protein binding assays for cyclic nucleotides.

In: Advances in Cyclic Nucleotide Research, Volume 2, New Assay Methods for Cyclic Nucleotides, p. 9, edited by P. Greengard, G.A. Robison and R. Paoletti.

Raven Press, New York, 1972

Goldfine, I.D., R. Perlman, and J. Roth:

Inhibition of cyclic 3',5'-AMP phosphodiesterase in islet cells and other tissues by tolbutamide.

Nature, 234, 295 (1971)

Goldfine, I.D., J. Roth, R.L. Perlman, and J. Muenzer:

Tolbutamide: an inhibitor of cyclic AMP phosphodiesterase in islet cells and other tissues.

Clin. Res., 19, 476 (1971)

Grette, K.:

Relaxing factors in extracts of blood platelets and its function in the cells.

Nature, 198, 488 (1963)

Grodsky, G.M., and L.L. Bennett:

Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas.

Diabetes, 15, 910 (1966)

Grodshy, G., D. Curry und L. Bennett:

Die Wirkung von HB 419 auf die Insulinsekretion in vitro.

In: HB 419. Tegernsee-Konferenz über das neue orale Antidiabeticum HB 419, 27. bis 29. Januar 1969.

Farbwerke Hoechst AG, Boehringer Mannheim GmbH (1969)

Haller, H., und St. E. Strauzenberg:

Orale Diabetestherapie.

Edition Leipzig 1966

Halpern, B.N., et F. Pacaud:

Technique de prélèvement d'échantillous de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction de plexus ophthalmique.

C. R. Soc. Biol. (Paris), 145, 1465 (1951)

Hardman, J.G.:

Other cyclic nucleotides.

In: G.A. Robison, R.W. Butcher and E.W. Sutherland: Cyclic AMP, p. 400; Academic Press, London and New York (1971)

Hardman, J.G., and E.W. Sutherland:

A cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase from heart with specifity for uridine 3',5'-phosphate.

J. Biol. Chem., 240, PC 3704 (1965)

Harwood, J.P., J. Moskowitz, and G. Krishna:

Dynamic aspects of hormonal control of the formation of cyclic AMP (c-AMP) in human and rabbit platelets.

Fed. Proc., 30, 285 (1971)

Hasselblatt, A.:

Die Hemmung der Ketonkörperbildung im Lebergewebe durch in vitro zugesetzte blutzuckersenkende Pharmaka.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path., 257, 281 (1967)

Hasselblatt, A.:

Die Hemmung der Ketogenese im Lebergewebe durch Tolbutamid und Glykodiazin in vitro.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path., 262, 152 (1969)

Hasselblatt, A., U. Panten und W. Poser:

Wirkung von Tolbutamid und HB 419 auf Bluglucose, Plasma-Corticosteron und Leberglykogen bei der Ratte.

Arzneimittel-Forsch. (Drug-Res.), 19, 1483 (1969)

Haslam, R.J.:

Drugs, platelet aggregation and cyclic AMP.

Canad. Med. Assoc. J., 108, 448 (1973)

Haslam, R.J., and J.A. Lynham:

Activation and inhibition of blood platelet adenylate cyclase by adenosine or by 2-chloroadenosine.

Life Sciences, part II, 11, 1143 (1972)

Haslam, R.J., and A. Taylor:

Effects of catecholamines on the formation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in human blood platelets.

Biochem. J., 125, 377 (1971)

Hellman, B., J. Sehlin, and I.-B. Täljedal:

The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues.
II. Site of action of Aolbutamide.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 1384 (1971)

Hellmann, B., J. Sehlin, and I.-B. Täljedal:

The pancreatic ß-cell recoguition of insulin secretagogues.
IV. Islet uptake of sulfonylureas.

Diabetologia, 9, 210 (1973)

Hepp, K.D.:

Inhibition of glucagon-stimulated adenyl cyclase by insulin.

FEBS Letters, 12, 263 (1971)

Hickler, R.B.:

In: Prostaglandin Symposium of the Worcester Foundation for Experimental Biology, edited by P.W. Ramwell and J. Shaw.

Interscience, N.Y., 279 (1968)

Hinz, M., J.J. Gagliardino und E.F. Pfeiffer:

Untersuchungen zum Gehalt von zyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) an isolierten Langerhans'schen Inseln.

Vortrag auf dem 8. Kongreß der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, München, 1973.

Novo-Service (Abstract-Band), S. 87 (1973)

Howell, S.L., and P.E. Lacy:

Studies on the effect of HB 419 (glibenclamide) on isolated islets and granules.

Horm. Metab. Res., 1, (suppl.), 45 (1969)

Horton, E.W.:

Prostaglandins

Monographs in Endocrinology, volume 7, edited by F. Gross, A. Labhart, T. Mann, L.T. Samuels, J. Zander
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1972)

Huggett, A.S.G., and D.A. Nixon:

Use of glucose oxidase, peroxidase, and o-dianisine in determination of urinary glucose.

Lancet, 1957/II, 368

Ingelfinger, J.R., and R.M. Hays:

Evidence that chlorpropamide and vasopressin share a common site of action.

J. Clin. Endocr., 29, 738 (1969)

Jaffee, B.M., J.N. Smith, W.T. Newton, and C.W. Parker:

Radioimmunoassay for prostaglandins.

Science, 171, 494 (1971)

Jakobs, K.H.,und G. Schultz:

Wirkungen verschiedener Hormone und Pharmaka auf die Adenyl-Cyclase der Rattenniere.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak., 266, 364 (1970)

Johnson, M.E.M., N.M. Das, F.R. Butcher, and J.N. Fain:

The regulation of gluconeogenesis in isolated rat liver cells by glucagon, insulin, dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, and fatty acids.

J. Biol. Chem., 247, 3229 (1972)

Jung, R., I. Mechler, S. Mocikat und E. Böhme:

Formation of guanosine-3':5'-monophosphate in human platelets.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 274, (suppl.), R 59 (1972)

Jungas, R.L.:

Role of cyclic-3',5'-AMP in the response of adipose tissue to insulin.

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 56, 757 (1966)

Kellner, H.-M., O. Christ, W. Rupp und W. Heptner:

Resorption, Verteilung und Ausscheidung nach Gabe von ^{14}C-markiertem HB 419 an Kaninchen, Ratten und Hunde.

Arzneimittel-Forsch. (Drug-Res.), 19, 1388 (1969)

Kikugawa, K., K. Iizuka, Y. Higuchi, H. Hirayama, and M. Ichino:

Platelet aggregation inhibitors. 2. Inhibition of platelet aggregation by 5'-, 2-, 6-, and 8-substituted adenosines.

J. Med. Chem., 15, 387 (1972)

Kirkeby, K.:

Fatty acid composition of serum lipids in hyper- and hypothyroidism.

Acta endocr. (Kbh.), 71, 62 (1972)

Klotz, U., and K. Stock:

Evidence for a cyclic nucleotide-phosphodiesterase with high specifity for cyclic uridine-3',5'-monophosphate in rat adipose tissue.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 269, 117 (1971)

Kolb, K.H., P.E. Schulze und U. Speek:

Pharmakokinetik von radioaktiv markiertem Glisoxepid beim Tier.

Arzneimittel-Forsch. (Drug-Res.), im Druck (1974)

Kocsis, J.J., J. Hernandovich, M.J. Silver, J.B. Smith, and C. Ingerman:

Duration of inhibition of platelet prostaglandin formation and aggregation by ingested aspirin or indomethacin.

Prostaglandins, 3, 141 (1973)

Kuehl, F.A. jr.:

Prostaglandins, cyclic nucleotides and cell function.

In: Prostaglandines 1973, Séminaire INSERM, p. 55. Éditions INSERM, Paris (1973)

Kuehl, F.A. jr., K.J. Cirillo, E.A. Ham, and J.L. Humes:

The regulatory role of prostaglandins on the cyclic 3',5'-AMP-System.
In: International Conference on Prostaglandins, Vienna, September 25 to 28, 1972, p. 155, edited by S. Bergström and S. Bernhard.

Advances in the Biosciences (edited by G. Raspé and S. Bernhard), vol. 9, Pergamon Press-Vieweg, Oxford, Edinburgh, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig (1973)

Kwaan, H.C., J.A. Colwell, S. Cruz, N. Suwanwela, and J.G. Dobbie:

Increased platelet aggregation in diabetes mellitus.

J. Lab. Clin. Med. 80, 236 (1972)

Kwaan, H.C., J.A. Colwell, and N. Suwanwela:

Disseminated intravascular coagulation in diabetes mellitus, with reference to the role of increased platelet aggregation.

Diabetes, 21, 108 (1972)

Lacy, P.E., M.M. Walker, and C.J. Fink:

Perifusion of isolated rat islets in vitro. Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin.

Diabetes, 21, 987 (1972)

Lacy, P.E.:

Beta cell secretion - from the standpoint of a pathobiologist.

Diabetes, 19, 895 (1970)

Lambert, A.E., B. Jeanrenaud, and A.E. Renold:

Enhancement by caffeine of glucagon-induced and tolbutamide-induced insulin release from isolated foetal pancreatic tissue.

Lancet, 1967/I, p. 819

Lasseter, K.C., G.S. Levey, R.F. Palmer, and J.S. McCarthy:

The effect of sulfonylurea drugs on rabbit myocardial contractility, canine Purkinje fiber auotmaticity and adenyl cyclase activity from rabbit an human hearts.

J. Clin. Invest., 51, 2429 (1972)

Laube, H., R. Fussgänger, R. Goberna, K. Schröder, K. Straub, K. Sussman, and E.F. Pfeiffer:

Effects of tolbutamide on insulin and glucagon secretion of the isolated perfused rat pancreas.

Horm. Metab. Res., 3, 238 (1971)

Lefebvre, P.J., and A.S. Luyckx:

Stimulation of insulin secretion after prostaglandin PGE_1 in the anesthetized dog.

Biochem. Pharmacol., 22, 1773 (1973)

Levey, G.S., R.F. Palmer, K.C. Lasseter, and J. McCarthy:

Effect of tolbutamide on adenyl cyclase of human heart and contractility of isolated rabbit atria.

J. Clin. Endocr. Metab., 33, 371 (1971)

Levey, G.S., W.J. Schmidt, and D. M. Mintz:

Activation of adenyl cyclase in a pancreatic islet cell adenoma by glucagon and tolbutamide.

Metabolism, 21, 93 (1972)

Levine, L., and H. van Vunakis:

Antigenic activity of prostaglandins.

Biochem. biophys. Res. Commun., 41, 1171 (1970)

Loge, O., W. Losert und P. Jahn:

Insulinfreisetzende Wirkung von Glymidin-Natrium (Glykodiazin), Isopropylnoradrenalin, Glucagon und Theophyllin an chinesischem Streifenhamstern mit spontanem oder streptozotocininduziertem Diabetes mellitus.

Res. exp. Med., 160, 292 (1973)

Losert, W.:

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkungsweise oraler Antidiabetica.

Habilitationsschrift, Fachbereich 2 'Klinisch-theoretische Medizin Steglitz', Freie Universität Berlin (1972)

Losert, W.:

Bedeutung von Adenosin-3',5'-monophosphat für Stoffwechselwirkungen verschiedener Hormone und Pharmaka.

Pharmazie, 28, 351 (1973)

Losert, W.:

Unveröffentlichte tierexperimentelle Untersuchungen zur Beeinflussung von Blutglucose und Seruminsulin durch ZK 28 2oo (1974).

Losert, W., und L. Blumenbach:

Unveröffentlichte humanpharmakologische Untersuchungen zur Beeinflussung von Blutglucose, Seruminsulin und FFS im Serum durch ZK 28 2oo (1974).

Losert, W., P. Jahn und O. Loge:

Beeinflussung der Insulinkonzentration im Serum von Ratten durch Analoga von Adenosin 3',5'-monophosphat.

Res. exp. Med., 160, 307 (1973)

Losert, W., O. Loge und H. Gutsche:

Unveröffentlichte Untersuchungen über Stoffwechselwirkungen von PGE_2 beim Menschen (1974).

Losert, W., O. Loge und P. Jahn:

Vergleich der ß-cytotropen Wirkung von Glymidin-Natrium (Glykodiazin), Glukagon und Isopropylnoradrenalin bei Ratten.

Arzneimittel-Forsch. (Drug-Res.), 23, 1251 (1973)

Losert, W., E. Schillinger, W. Kraaz, O. Loge und P. Jahn:

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkungsweise der Biguanide 1. Mitteilung: Problemstellung - Versuche mit hypoglykämisch wirkenden Biguaniddosen.

Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.), 22, 1157 (1972)

Loubatières, A.:

Étude expérimentale chez le chien des accidents nerveux irréversibles consécutif à hypoglycémie prolongeé provoquée pa le sulfa-isopropylthiodiazol.

43e Congrès des méd. alién. neurol. de France, Montpellier, p. 415, Edition: Masson, Paris (1942)

Loubatières, A.:

Rélation de mécanisme de l'action hypoglycémiante du p-amino-benzène-sulfamido-isopropylthiodiazol (2254 R.P.).

C.R.Soc. Biol. 138, 766 (1944)

Lüscher, E.F., and M. Bettex-Galland:

Thrombosthenin, the contractile protein of blood platelets.

New facts and problems.

Path.-Biol., 20, suppl., 89 (1972)

Lundbaek, K., K. Nielsen, and O.J. Rafaelsen:

Studies on the effect of oral antidiabetic compounds on glucose tolerance, on islet cell structure, and on the in vitro metabolism of isolated muscle.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 74, 419 (1959)

Madsen, J.:

Extrapancreatic and intrapancreatic action of antidiabetic sulfonylureas. A review.

Acta med. scand. Suppl. 476, 109 (1967)

Malaisse, W.J.:

Role of calcium in insulin secretion.

Israel J. Med. Sci., 8, 244 (1972)

Malaisse, W.J.:

Theophyllin-induced translocation of calcium in the pancreatic beta cell: inhibition by deuterium oxide.

Nature (New Biology), 242, 189 (1973a)

Malaisse, W.J.:

Effect of glibenclamide upon ^{45}calcium efflux from perifused islets.

Arch. internat. Pharmacoclyn. Ther., 203, 403 (1973 b)

Malaisse-Lagae, F., M.H. Greider, W.J. Malaisse, and P.E. Lacy:

The stimulus - secretion coupling of glucose-induced insulin release.
IV. The effect of vincristine and deuterium oxide on the microtubular system of the pancreatic beta cell.

J. Cell Biology, 49, 530 (1970)

Malaisse, W.J., M. Mahy, G.R. Brisson, and F. Malaisse-Lagae:

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release.
VIII. Combined effects of glucose and sulfonylureas.

Europ. J. Clin. Invest., 2, 85 (1972)

Malaisse, W.J., M. Mahy, and F. Malaisse-Lagae:

Effect of sulfonylureas on calcium uptake and insulin secretion by islets of Langerhans.

Arch. internat. Pharmacoclyn. Ther., 192, 205 (1971)

Malaisse, W., and F. Malaisse-Lagae:

Effects of glycodiazin and glybenclamide upon insulin secretion in vitro.

Europ. J. Pharmacol., 9, 93 (1970)

Malaisse, W.J., F. Malaisse-Lagae, M.O. Walker, and P.E. Lacy:

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release.
V. The participation of a microtubular-microfilamentous system.

Diabetes, 20, 257 (1971)

Malaisse, W.J., D.G. Pipeleers, and M. Mahy:

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release.
XII. Effects of diazoxide and gliclazide upon ^{45}calcium efflux from perifused islets.

Diabetologia, 9, 1 (1973)

Mannesmann, G.:

Unveröffentlichte Untersuchungen zur Beeinflussung der Kontraktilität der Herzmuskulatur von Katzen durch Glisoxepid (1974)

McKenzie, S.G., and H.P. Bär:

On the mechanism of adenyl cyclase inhibition by adenosine.

Canad. J. Physiol. Pharmacol., 53, 190 (1963)

Meinders, A.E., J.L. Touber, and L.A. de Vries:

Chlorpropamide treatment in diabetes insipidus.

Lancet, 1967/II, p. 544

Menahan, L.A., and O. Wieland:

The role of endogenous lipid in gluconeogenesis and ketogenesis of perfused rat liver.

Europ. J. Biochem., 9, 182 (1969)

Mendoza, S.:

Effect of chlorpropamide on the permeability of the urinary bladder of the toad and the response to vasopressin, adenosine-3',5'-monophosphate and theophylline.

Endocrinology, 84, 411 (1969)

Miller, E.A., P.H. Wright, and D.O. Allen:

Effect of hormones on accumulation of cyclic AMP-^{14}C in isolated pancreatic islets of rats.

Endocrinology, 91, 1117 (1972)

Miller, M., and A.M. Moses:

Mechanism of chlorpropamide action in diabetes insipidus.

J. Clin. Endocr., 30, 488 (1970 a)

Miller, M., and A.M. Moses:

Potentiation of vasopressin action by chlorpropamide in vivo.

Endocrinology, 86, 1024 (1970 b)

Mills, D.C.B., and J.B. Smith:

The influence on platelet aggregation of drugs that affect the accumulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in platelets.

Biochem. J., 121, 185 (1971)

Milner, R.D.G., and C.N. Hales:

The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro.

Diabetologia, 3, 47 (1967)

Morczinneck, K.:

Vergleichende tierexperimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der hypoglykämischen Wirkung von Glymidin-Natrium, Glydanil-Natrium und Glisoxamid.

Inauguraldissertation, Medizinische Fachbereiche der Freien Universität Berlin (1971)

Morgan, C.R., and A. Lazarow:

Immunoassay of insulin using a two antibody system.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 29 (1962)

Morgan, C.R., and A. Lazarow:

Immunoassay of insulin: Two antibody system.

Diabetes, 12, 115 (1963)

Morgan, C.R., R.L. Sorenson, and A. Lazarow:

Further studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay system.

Diabetes, 13, 579 (1964)

Mustard, J.F., and M.A. Packham:

Factors influencing platelet function: adhesion, release, and aggregation.

Pharmacol. Rev., 22, 97 (1970)

Orci, L., K.M. Gabbay, and W.J. Malaisse:

Pancreatic beta cell web: its possible role in insulin secretion.

Science, 175, 1128 (1972)

Pfeiffer, E.F., K. Schöffling und H. Ditschuneit:

Der Wirkungsmechanismus der oralen Antidiabetica. Die blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffe und Sulfonamide.
In: Handbuch des Diabetes mellitus, Pathophysiologie und Klinik, herausgegeben von E.F. Pfeiffer, Band I, S. 637, J.F. Lehmanns Verlag, München (1969)

Poser, W., J. Schönborn, U. Panten, E. von Kriegstein, and A. Hasselblatt:

Effect of glibenclamide on hepatic fructose metabolism.

Horm. Metab. Res., 3 347 (1971)

Puls, W., W. Losert, O. Loge, E. Schillinger, U. Keup und H. Kroneberg:

Zur Pharmakologie von Glisoxepid, einem neuen oralen Antidiabeticum.

Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.), im Druck (1974)

Rabinowitz, B., and J. Katz:

Method for determination of cyclic AMP in plasma.

Clin. Chemistry, 19, 312 (1973)

Robison, G.A., A. Arnold, and R.C. Hartmann:

Divergent effects of epinephrine and prostaglandin E_1 on the level of cyclic AMP in human blood platelets.

Pharmacol. Res. Commun., 1, 325 (1969)

Robison, G.A., R.W. Butcher, and E.W. Sutherland:

Cyclic AMP.

Academic Press, New York, London (1971)

Rosak, C., K.M. Bartelt, J. Beyer, and K. Schöffling:

Studies on the site of action of tolbutamide in the lipolytic system.

Diabetologia, 8, 185 (1972)

Rosak, C., K.M. Bartelt, E. Haupt, J. Beyer und K. Schöffling:

Extrapankreatische Wirkung von Sulfonylharnstoffen. V. Untersuchungen zur antilipolytischen Eigenschaft von Glibornurid.

Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.), 22, 2182 (1972)

Rosen, O.M., A.H. Hirsch, and E.N. Goren:

Factors which influence cyclic AMP formation and degradation in an islet cell tumor of the syrian hamster.

Arch. Biochem. Biophys., 146, 660 (1971)

Radó, J.P., and L. Borbély:

Glybenclamide enhancement of polyurea in patients with pituitary diabetes insipidus (preliminary report).

Endokrinologie, 59, 397 (1972)

Rafaelsen, O.J.:

Action of oral antidiabetic drugs on carbohydrate metabolism of isolated rat diaphragm.

Metabolism, 8, 195 (1959)

Ramwell, P.:

Diskussionsbemerkung
In: Prostaglandins in Cellular Biology, p. 76, edited by P.W. Ramwell and B.B. Pharriss.

Plenum Press, New York, London (1972)

Ramwell, P.W., and B.B. Pharriss (Editors):

Prostaglandins in Cellular Biology.
Proceedings of the ALZA Conference on Prostaglandins in Cellular Biology and the Inflammatory Process, held in Carmel, California, October 24 - 26, 1971.

Plenum Press, New York, London (1972)

Raptis, S., Sh. Nadjafi, L. v. Berger, F. Schmid, V.E. Hrstka, G. Rothenbuchner und E.F. Pfeiffer:

Insulinsekretion, Blutzucker und Serumkonzentration von oral verabreichten Sulfonylharnstoffen (Tolbutamid, Glibenclamid) im Cubitalvenen- und Pfortaderblut des Menschen.

Vortrag auf dem 8. Kongreß der Deutschen Diabetesgesellschaft, München, 1973.

Novo-Service (Abstract-Band), S. 181 (1973)

Renold, A.E., G.R. Zahnd, B. Jeanrenaud, and B.R. Boshell:

Some effects of tolbutamide and chlorpropamide in vitro.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 74, 490 (1959)

Roth, J. (Moderator), Th.S. Prout, I.D. Goldfine, S.M. Wolfe, J. Muenzer, L.E. Grauer, M.L. Marcus (Discussants):

Sulfonylureas: Effects in vivo and in vitro.

Ann. Intern. Med., 75, 607 (1971)

Rufer, C., H. Biere, H. Ahrens, O. Loge und E. Schröder:

Blood glucose lowering sulfonamides with asymmetrc carbon atoms.1.

J. Med. Chem. (im Druck) (1974)

Salzman, E.W.:

Cyclic AMP and platelet function.

In: Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston, edited by D. Deykin and E.E. Parris, New Engl. J. Med., 286, 358 (1972)

Salzman, E.W., and L. Levine:

Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in human blood platelets. II. Effect of N^6, 2'-O-dibutyryl 3',5'-adenosine monophosphate on platelet function.

J. Clin. Invest., 50, 131 (1971)

Salzman, E.W., and L.L. Neri:

Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in human blood platelets.

Nature, 224, 609 (1969)

Salzman, E.W., and L.L. Neri:

Cyclic-3',5'-adenosine monophosphate in human blood platelets. III. The role of cyclic AMP in platelet aggregation.

Ser. Haemat., 3, 100 (1970)

Samols, E., J. Tyler, and P. Mialhe:

Suppression of pancreatic glucagon release by the hypoglycemic sulfonylureas.

Lancet 1969/I, p. 174

Sams, D.J., and W. Montague:

The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release.
Properties of islet-cell adenosine 3':5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase.

Biochem. J., 129, 945 (1972)

Schillinger, E.:

Unveröffentlichte Untersuchungen über die Beeinflussung der Lipolyse durch Glidanil-Natrium (1972).

Schillinger, E., O. Loge und W. Losert:

Einfluß von Glisoxepid auf die Lipolyse (in vitro- und in vivo-Untersuchungen)

Vortrag auf dem Pro-Diaban^{R}-Symposium, Berlin, 7.-8.12.73, im Druck (1974)

Schöffling, K., E. Haupt, W. Köberich und J. Beyer:

Neuere Erkenntnisse bei der Anwendung von blutzuckersenkenden Sulfonamiden der ersten und zweiten Generation.

Klin. Wschr., 51, 68 (1973)

Schultz, G.:

Cyclische Nucleotide als intracelluläre Überträgerstoffe bei Hormonwirkungen.

Klin. Wschr., 49, 1049 (1971)

Schultz, G.:

Die Bedeutung von cyclischem AMP bei Hormonwirkungen.

Internist, 13, 159 (1972)

Schultz, J., and J.W. Daly:

Adenosine-3',5'-monophosphate in cerebral cortical slices from guinea pig and rat: effect of α-and ß-adrenergic compounds.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 277, (suppl), R 70 (1973)

Schwabe, U.:

Adenosine as mediator of insulin effects on fat cells.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 277, (suppl), R 71 (1973)

Schwabe, U., und R. Ebert:

Wirkung von heterocyclischem Lipolysehemmstoffen auf die Aktivität der 3',5'-AMP-Phosphodiesterase.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path., 263, 251 (1969)

Schwabe, U., and R. Ebert:

Defferent effects of lipolytic hormones and inhibitors of phosphodiesterase on cyclic 3',5'-AMP livels in isolated fat cells.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 274, (suppl,), R 105 (1972)

Senft, G., G. Schultz, K. Munske, and M. Hoffmann:

Influence of insulin on cyclic 3',5'-AMP phosphodiesterase activity in liver, skeletal muscle, adipose tissue, and kidney.

Diabetologia, 4, 322 (1968)

Shaw, J.E., and P.W. Ramwell:

Inhibition of gastric secretion in rats by prostaglandin E_1.

In: Prostaglandin Symposium of the Worcester Foundation for Experimental Biology, p. 55, edeited by P.W. Ramwell and J.E. Shaw. Interscience, New York, N.Y. (1968)

Shio, H., and P.W. Ramwell:

The platelet as a model of prostaglandin action.

Intra-Science Chem. Rpt., 6, 25 (1972)

Shio, H., and P.W. Ramwell:

Prostaglandin E(1) and E(2): Qualitative difference in platelet aggregation.

In: Prostaglandins in Cellular Biology, p. 77, edited by P.W. Ramwell and B.B. Pharriss.

Plenum Press, New York, London (1972)

Shio, H., P.W. Ramwell, and S.J. Jessup:

Prostaglandin E_2: Effects on aggregation, shape change and cyclic AMP of rat platelets.

Prostaglandins, 1, 29 (1972)

Shio, H., A.M. Plasse, and P.W. Ramwell:

Platelet swelling and prostaglandins.

Microvasc. Res., 2, 294 (1970)

Shio, H., J. Shaw, and P.W. Ramwell:

Relation of cyclic AMP to the release and action of prostaglandins.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 185, 327 (1971)

Silver, M.J., J.B. Schmith, C. Ingerman, and J.J. Kocsis:

Human blood prostaglandins during clotting.

Prostaglandins, 1, 429 (1972)

Smith, J.B., C. Ingerman, J.J. Kocsis, and J.M. Silver:

Formation of prostaglandins during the aggregation of human blood platelets.

J. Clin. Invest., 52, 965 (1973)

Speck, U.:

Unveröffentlichte Untersuchungen zur Pharmakokinketik von ZK 28 2oo beim Tier (1973).

Srivastava, K.C., and J. Clausen:

Synthesis of prostaglandins (PGE, PGF, PGA and PGB) in human platelets.

Lipids, 7, 762 (1972)

Statland, B.E., B.M. Heagan, and J.G. White:

Uptake of calcium by platelet relaxing factor.

Nature, 223, 521 (1969)

Trautsehold, I., A. Dwenger und G. Schweitzer:

Über die Bedeutung des c-AMP bei der Insulinsekretion.

Vortrag auf dem 8. Kongreß der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, München, 1973.

Novo-Service (Abstract-Band), S. 84 (1973)

Turtle, J.R., and D.M. Kipnis:

An adrenergic receptor mechanism for the control of cyclic 3',5' adenosine monophosphate synthesis in tissues.

Biochem. biophys. Res. Commun., 28, 797 (1967)

Vane, J.R.:

Prostaglandins and the aspirin like drugs.

Hospital Practice, 7, 61 (1972 a)

Vane, J.R.:

Prostaglandins in the inflammatory response.

In: Inflammation: mechanism and control; edited by I.H. Lepow and P.A. Ward, Academic Press, New York (1972 b)

Vane, J.R.:

Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of action of aspirin like drugs.

In: International Conference on Prostaglandins, Vienna, September 25 - 28, 1972; edited by S. Bergström and S. Bernhard.

Advances in the Biosciences, Vol. 9, p. 395; edited by G. Raspé and S. Bernhard.
Pergamon Press-Vieweg, Oxford, Edinburgh, Toronto, Sydney, Braunschweig (1973).

Vigdahl, R.C., N.R. Marquis, and P.A. Tavormina:

Platelet aggregation: II. Adenylcyclase, prostaglandin E_1, and calcium.

Biochem. biophys. Res. Commun., 37, 409 (1969)

Villar-Palasi, C., J. Larner, and L.C. Shen:

Glycogen metabolism and the mechanism of action of cyclic AMP.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 185, 74 (1971)

Weber, E.:

Grundriß der biologischen Statistik.

S. 501, S. Fischer-Verlag, Stuttgart (1967)

Werner,W., J.-G. Rey und H. Wielinger:

Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode.

Z. analyt. Chemie, 252, 224 (1970)

Westermann, E.:

Introdactury Remark, in: Pharmacology of Lipid Metabolism.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak., 269, 308 (1971)

Westermann,E. and K. Stock:

Inhibitors of Lipolysis: Potency and mode of action of α- and β- adrenolytics, methoxamine derivatives, Prosta glandin E_1 and phenylisopropyladenosine.
In: Adipose Tissue, Regulation and Metabolic Functions, p.47; edited by B. Jeanrenaud and D. Hepp.

Georg-Thieme-Verlag; Stuttgart; Academic Press, New York, London (1970).

Wigger, W., J. Stegemann, F. Scheler und W. Creutzfeldt:

Antiduretischer Effekt oraler Antidiabetica vom Typ der Sulfonylharnstoffe beim Diabetes insipidus centralis.

Diabetologia, 5, 136 (1969)

Willis, A.L., P. Davison, P.W. Ramwell, W.E. Brocklehurst, and B. Smith:

Release and actions of prostaglandins in inflammation and fever: inhibition by anti-inflammatory and anti-pyretic drugs.

In: Prostaglandins in Cellular Biology, p. 227, edited by P.W. Ramwell and B.B. Pharriss, Plenum Press, London and New York (1972)

Wray, H.L., and A.W. Harris:

Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent proteinkinase in adipose tissue: inhibition by tolbutamide.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 291 (1973)

Zieve, Ph.D., and W.B. Greenough III:

Adenyl cyclase in human platelets:activity and responsiveness.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 462 (1969)

7. L e b e n s l a u f

Name:	Christa S c h o l z
geboren:	am 11. August 1938
in:	Berlin
Eltern:	Fritz Scholz und Gertrud Scholz geb. Prenzlow
Bildungsweg:	15./ 16. Volksschule in Berlin - Rudow
	Albrecht-Dürer-Gymnasium in Berlin-Neukölln
	März 1957 Abitur
	1957 - 1959 Schwesternschule im Wenckebach-Krkhs.
	März 1959 Krankenpflegeexamen
	1959 - 1966 Operationsschwester im Wenckebach-Krkhs.
	Wintersemester 1966/67 Immatrikulation an der F.U. Berlin
	September 1967 Vorphysikum
	März 1969 Physikum
	August 1972 Staatsexamen
	Oktober 1972 - Januar 1973 Doktorandin,
	Februar 1973 - Mai 1973 Medizinalassistentin und
	Juni 1973 - August 1973 Informandin in den Forschungslaboratorien der Schering A.G. Berlin
	Ab September 1973 Medizinalassistentin auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Soltau.

D a n k

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz.Dr.med. Wolfgang Losert für die Überlassung des Themas und seinen steten persönlichen Einsatz bei allen Problemen. Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Departments Allgemeine Pharmakologie der Schering A.G. für die freundliche Unterstützung und Frau Annegret Hoder für die ausgezeichnete technische Mitarbeit.